

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS



**“Caracterização do papel dos genes *TYMS* e *MTR* no desenvolvimento de Cancro Colo-Rectal”**

Bruno Filipe Sousa Carmona

*Doutoramento em Ciências da Vida*

2015



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS



**“Caracterização do papel dos genes *TYMS* e *MTR* no desenvolvimento de Cancro Colo-Rectal”**

**Bruno Filipe Sousa Carmona**

Tese orientada pelo Professor Doutor Rui Miguel Duque de Brito e pelo  
Professor Doutor José Alexandre de Gusmão Rueff

*Doutoramento em Ciências da Vida*  
*Especialidade em Genética*

2015





Esta tese foi suportada por uma Bolsa de Doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia SFRH/BD/31143/2006



**“A dignidade da inteligência está em reconhecer  
que é limitada e que o Universo está fora dela”**

Fernando Pessoa (Barão de Teive) – *A Educação do Estóico*



Em resultado do trabalhado realizado na presente Tese de Doutoramento foram obtidas as seguintes publicações:

- a) Bruno Carmona, Catarina Guerreiro, Marília Cravo, Carlos Nobre-Leitão, Miguel Brito  
5' and 3' UTR Thymidylate Synthase Polymorphisms modulate the risk of colorectal cancer independently of the intake of methyl group donors.  
Molecular Medicine Reports, 2008, Outubro; 1(5); 747-52
- b) Catarina Guerreiro, Bruno Carmona, Susana Gonçalves, Elisabete Carolino, Paula Fidalgo, Miguel Brito, Carlos Nobre-Leitão, Marília Cravo  
Polymorphisms in 5, 10-methylenetetrahydrofolate, methionine synthase and cytoplasmatic serine hydroxymethyltransferase affect the risk of colorectal cancer (CRC) in Portuguese patients according to folate, but not other methyl-related nutrients and/or alcohol intake.  
American Journal of Clinical Nutrition, 2008 Nov; 88(5); 1413-8
- c) Bruno Carmona, Marília Cravo, Miguel Brito  
Thymidylate Synthase and Methionine Synthase are overexpressed in colorectal cancer.  
Submetido
- d) Bruno Carmona, Miguel Brito, José Rueff  
One-carbon metabolism genes polymorphisms and colorectal cancer: a review.  
*In prep*



## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo dos anos que decorreram desde o início desta Tese de Doutoramento muitas foram as pessoas que ajudaram a percorrer este caminho. Desta forma gostaria de agradecer a TODOS os que de alguma forma contribuíram para que este trabalho chegasse a bom porto.

Em particular gostaria de agradecer:

Ao Professor Doutor Miguel Brito por me ter acompanhado nesta aventura de me ter como aluno de Doutoramento, por me ter ajudado a construir este projecto, pela orientação e críticas feitas ao longo de todos estes anos. Obrigado por me ter ajudado em todos os momentos, os bons e os maus, de forma a ultrapassar todos os obstáculos que sempre surgem quando nos propomos a um projecto deste tipo. Obrigado acima de tudo por em momentos-chave da minha vida ter tido a capacidade de com uma palavra amiga ajudar a superar as dificuldades.

Ao Professor Doutor José Rueff por ter aceitado o desafio de me ter como seu aluno de doutoramento, pela disponibilidade demonstrada, pelo acompanhamento dado ao longo de todo o tempo e pelas palavras amigas com que sempre me recebeu e encorajou.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pela Bolsa de Doutoramento concedida (SFRH/BD/31143/2006)

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa por me ter acolhido nos seus laboratórios para a realização deste projecto.

À Professora Doutora Marília Cravo pela ajuda na obtenção das amostras e pela construção do projecto que esteve na base desta tese, assim como na discussão dos resultados obtidos.

À Professora Doutora Catarina Guerreiro pela disponibilização dos dados alimentares, pela amizade e companheirismo no laboratório.

Ao longo de todos estes anos muitas pessoas passaram pelo laboratório onde este trabalho decorreu. A todas elas gostaria de agradecer pelos bons momentos passados enquanto colegas de trabalho. Gostaria de começar por agradecer à Joana Malta-Vacas, a Cátia Aires e a Patrícia Costa. Com elas demos início ao laboratório de investigação, uma verdadeira aventura, na qual aprendi bastante com todas elas. Obrigado pela ajuda nos trabalhos, nas discussões realizadas e pela amizade criada. Gostaria ainda de agradecer à Dolores Prudêncio, Elisabete Costa, Filipa Quintaneiro, Rui Plácido, Sandra Raicar, Susana Gonçalves, Gilberto Matias, João Lourenço, Ana Moleirinho, Carina Ladeira. Gostaria ainda de agradecer à Alice Melão, à Carla Mota e à Ana Oliveira pela amizade especial criada entre nós.

Não só no laboratório foram criadas amizades e muitas outras pessoas me ajudaram neste caminho mesmo não trabalhando neste projecto comigo. Assim gostaria de agradecer à Professora Doutora Luísa Veiga pela amizade, boa disposição e pela preocupação que sempre demonstrou por mim. Ao Professor Doutor Mário Pádua pela grande amizade criada, por ser uma pessoa que me apoiou sempre e que me ensinou muito sobre ciência e sobre a vida. Ao Professor Doutor Mário Gomes pelo bom amigo que é e pelos momentos de diversão que sempre consegue criar. Ao Professor Doutor Paulo Guerreiro pela amizade demonstrada.

À Professora Doutora Helena Soares por toda uma amizade que foi crescendo, por todo o apoio, conselhos científicos e pessoais que me foi dando ao longo do tempo. Tenho muito gosto em poder considerá-la uma amiga. Agradecer ao grupo de trabalho da Professora Helena Soares onde sempre me senti em casa e por me tratarem como pertencendo ao grupo. Neste lote de pessoas quero dar destaque à Professora Doutora Sofia Nolasco que é uma verdadeira amiga e uma fonte enorme de boa disposição. Muito obrigado a ela por todo o apoio laboratorial e pelas palavras amigas que sempre teve para mim.

Ao meu grande Amigo João Gonçalves, por todo o apoio que me tem dado nos quase 16 anos(!!!) que nos conhecemos. Sem o seu apoio, mesmo à distância, todo este percurso teria sido muito mais difícil.

À minha grande Amiga Paula Ferreira, por ter sido uma fonte inesgotável de apoio, um ombro amigo nos momentos mais difíceis e alguém com quem pude partilhar as minhas alegrias. Muito obrigado por tudo.

À minha Família por todo o apoio e Amor incondicional dado, principalmente nos momentos mais difíceis sempre soube que eles estavam lá para mim. Não posso deixar de dar uma palavra especial de agradecimento aos meus Avós, uma fonte de inspiração para mim; ao meu Pai, por ser a pessoa com a palavra certa sempre que precisei; à minha Mãe, sempre que precisei esteve lá para mim, todos os dias desde o dia 0; ao meu Irmão, por ser quem sempre me ouviu quando mais precisei.

À Rita, por todo o tempo de ausência que suportou, por todos os dias difíceis que me ajudou a ultrapassar, por toda a confiança e apoio que me demonstrou nestes anos. Obrigado por toda a serenidade e Amor que me transmitiste.

À minha filha Maria, que se tornou na minha fonte inesgotável de Felicidade, Energia e Amor desde o dia que nasceu.



## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XXI</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1. <i>Cancro</i> .....	3
1.1 Cancro do Cólon e Recto .....	4
Caracterização Clínica e Terapêutica .....	4
Factores Genéticos.....	6
Factores Ambientais .....	7
Inflamação .....	8
2. <i>Ciclo do Folato</i> .....	9
2.1 Timidilato Sintetase .....	12
Estrutura do Gene e Proteína .....	12
Regulação da Expressão e Actividade .....	15
Polimorfismos .....	16
Patologias Associadas.....	17
Inibidores .....	20
2.2 Metionina Sintetase .....	21
Estrutura do Gene e Proteína .....	21
Regulação da Expressão e Actividade .....	23
Polimorfismos .....	24
Patologias associadas .....	24
Inibidores .....	26
Factores Nutricionais .....	26
3. <i>Doença de Crohn</i> .....	27
Caracterização Clínica e Terapêutica .....	28
Factores Genéticos.....	29
Factores Ambientais .....	31
4. <i>Referências Bibliográficas</i> .....	34
<b>II. OBJECTIVOS .....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>69</b>
I. <b>ESTUDO 1</b> – Risco de Cancro Colo-Rectal associado ao polimorfismo C677T da 5,10-Metilenotetrahidofolato Reductase, em pacientes Portugueses, depende da ingestão de nutrientes dadores de grupos metilo .....	71
II. <b>ESTUDO 2</b> – Polimorfismos 5' e 3' UTR da Timidilato Sintetase modulam o risco de Cancro Colo-Rectal de forma independente da ingestão de dadores do grupo metilo .....	87

III. ESTUDO 3 – Timidilato Sintetase e Metionina Sintetase encontram-se sobre-expressas em Cancro do Cólon e Recto.....	103
IV. ESTUDO 4 – Polimorfismo A2756G MTR como factor de susceptibilidade para o desenvolvimento de Doença de Crohn .....	119
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>135</b>
I. DISCUSSÃO .....	137
II. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	145
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	148
<b>ANEXOS .....</b>	<b>153</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

### **CAPÍTULO 1**

Figura 1 - Ciclo do Folato.....	10
Figura 2 - Esquema do gene da timidilato sintetase humana.....	12
Figura 3 - Esquema dos transcritos possíveis do gene timidilato sintetase.....	13
Figura 4 - Diagrama cristalográfico do dímero da enzima timidilato sintetase obtido por difracção de raio-x com uma resolução de 1,8 Å.....	14
Figura 5 - Esquema do gene da metionina sintetase humana.....	21
Figura 6 - Diagrama cristalográfico do domínio de activação da enzima metionina sintetase obtido por difracção de raio-x com uma resolução de 1,8 Å.....	22

### **CAPÍTULO 2**

#### **Estudo 2**

Figura 1 – Ciclo do Folato.....	91
---------------------------------	----

#### **Estudo 3**

Figura 1 – Ciclo do Folato.....	106
Figura 2 – Expressão tumoral relativa por amostra.....	111
Figura 3 - Média da expressão tumoral relativa dos genes SHMT1 e TYMS, de acordo com os respectivos polimorfismos.....	112

#### **Estudo 4**

Figura 1 – Ciclo do Folato.....	123
---------------------------------	-----



## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Resumo dos estudos efectuados sobre os polimorfismos da TYMS.....	19
--	----

### CAPÍTULO 2

#### Estudo 1

Tabela 1 - Ingestão nutricional diária dos participantes.....	78
Tabela 2 - Frequências genótípicas e associação com o risco de CCR.....	79
Tabela 3 - <i>Odds Ratio</i> (OR) para o risco de CCR de acordo com o polimorfismo C677T MTHFR e a dieta.....	80

#### Estudo 2

Tabela 1 - Média da ingestão diária dos nutrientes nas duas populações.....	93
Tabela 2 - Frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos da TYMS nas duas Populações.....	94
Tabela 3 - Análise de <i>odds ratio</i> para os polimorfismos da TYMS.....	95

#### Estudo 3

Tabela 1 - Primers e sondas para a genotipagem e expressão.....	108
Tabela 2 – Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos genes MTR, MTHFR, SHMT1 e TYMS.....	110
Tabela 3 - Expressão relativa nas amostras tumorais.....	111

#### Estudo 4

Tabela 1 - Características dos pacientes de DC.....	126
Tabela 2 - Ingestão Média Diária de Macro e Micronutrientes.....	126
Tabela 3 - Distribuição Genotípica do Polimorfismo A2756G MTR e Risco de DC.....	127



## LISTA DE ABREVIATURAS

- 10-FTHF** – 10-formiltetrahidrofolato  
**28pbrpt** – Repetições de 28pb da TYMS  
**5,10-MTHF** – 5,10-metilenotetrahidrofolato  
**5-ASA** – 5-aminosalicilatos  
**5-FdUMP** – 5-fluorodesoxiuridina monofosfato  
**5-FU** – 5-Fluorouracilo  
**5-MC** – 5-metilcitosina  
**5-MTHF** – 5-metiltetrahidrofolato  
**6pbdel** – Deleção de 6pb da TYMS  
**aa** – Aminoácido  
**ADH** – Ácido docohexanóico  
**AEP** – Ácido eicosapentaenóico  
**AGPI** – Ácido gordo polinsaturado  
**Apc** – *Adenomatou polyposis coli*  
**ATG16L1** – *Autophagy-related protein 16-1*  
**AZA** – Azatioprina  
**BRCA1** – *Breast cancer 1*  
**BRCA2** – *Breast cancer 2*  
**CAP** – Capecitabina  
**CBS** – Cistationina beta-sintetase  
**CCR** – Cancro colo-rectal  
**CDK4** – *Cyclin-dependent kinase 4*  
**Cdkn2a** – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*  
**DC** – Doença de Crohn  
**Dcc** – Deletado em cancro colo-rectal  
**DHF** – Dihidrofolato  
**DHFR** – Dihidrofolato reductase  
**DNA** – Ácido desoxiribonucleico (*desoxiribonucleic acid*)  
**dTMP** – desoxitimidilato monofosfato  
**dUMP** – desoxiuridilato monofosfato  
**EUA** – Estados Unidos da América  
**FOLFIRI** – Ácido folínico e irinotecano  
**FOLFOX** – Ácido folínico e oxiplatina  
**IBD** – Doença inflamatórias do intestino (*inflammatory bowel disease*)  
**IL10** – Interleucina 10  
**IL17** – Interleucina 17  
**IL23** – Interleucina 23  
**IL23R** – Receptor da interleucina 23

**IL8** – Interleucina 8

**IRES** – *Internal ribosome entry site*

**K-Ras** - *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

**LV** – Leucovirina

**MDR1** – *Multidrug resistance protein 1*

**Mlh 2** – *MutL homolog 2*

**Mlh1** – *MutL homolog 1*

**MMR** – *Mismatch repair genes*

**mRNA** – RNA mensageiro

**MTHFR** – Metilenotetrahidrofolato reductase

**MTR** – Metionina sintetase

**MTRR** – Metionina sintetase reductase

**NOD2** – *Nucleotide-binding oligomerization domain 2*

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**ORF** – *Open reading frame*

**p53** – Proteína tumoral P53

**pb** – Pares de bases

**SAH** – S-adenosilhomocisteína

**SAM** – S-adenosilmetionina

**SHMT** – Serina hidroximetiltransferase

**Th17** – *T-helper 17*

**THF** – Tetrahidrofolato

**TNF $\alpha$**  – *Tumor necrosis factor  $\alpha$*

**TNM** – Tumor, nódulo linfático, metástases

**TPMT** – *Thiopurine S-methyltransferase*

**TYMS** – Timidilato sintetase

**USF-1** – *Upstream stimulatory factor 1*

**UTR** – *Untranslated region*



## **RESUMO**

O cancro colo-rectal (CCR) é um dos cancros que possui maior taxa de mortalidade a nível mundial. Em Portugal esta patologia é responsável pela morte de cerca de 3700 pessoas por ano, sendo que estes números aumentam de ano para ano.

Ao longo das últimas décadas o papel das alterações genéticas na etiologia das patologias oncológicas tem vindo a ter cada vez mais um maior destaque. O número de estudos que avaliam a importância de polimorfismos, mutações, alterações na regulação génica e interações entre genes no desenvolvimento destas patologias tem aumentado exponencialmente. Com o aumento do conhecimento da forma como estas alterações influenciam o desenvolvimento do cancro surgiram os primeiros meios de diagnóstico genético, levando assim a uma alteração da forma como são encarados o diagnóstico e a prevenção destas doenças. No CCR as formas hereditárias com alterações genéticas inequivocamente identificadas representam apenas 5% dos casos. Existem cerca de 25% que representam formas hereditárias para as quais ainda não foram estabelecidos os padrões de alterações genéticas subjacentes. Desta forma, estudos que venham contribuir para um maior conhecimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento da susceptibilidade dos indivíduos para o desenvolvimento de CCR são extremamente importantes.

O CCR é uma patologia multifactorial, onde factores genéticos interagem com factores ambientais no surgimento e desenvolvimento da doença. Assim, torna-se essencial integrar o estudo das alterações genéticas no contexto ambiental onde os indivíduos em estudo se encontram. No caso desta patologia um dos principais factores ambientais estudado é a nutrição. Vários estudos têm sido realizados ao longo dos últimos anos de forma a compreender como pode a ingestão dos nutrientes influenciar o desenvolvimento de CCR e de que forma interage com as alterações genéticas individuais. O ciclo do folato é um dos processos metabólicos onde o papel da nutrição em interacção com alterações genéticas mais tem sido estudado nos últimos anos. Deste cruzamento entre o estudo das alterações genéticas e ambientais surge a Nutrigenética.

O conjunto de estudos da presente tese tem como objectivo aumentar o conhecimento do papel das alterações em genes do ciclo do folato, em interacção com factores nutricionais e de estilo de vida, não só no desenvolvimento de CCR, mas também de outra patologia do tracto gastrointestinal, a Doença de Crohn (DC), uma doença inflamatória muitas vezes associada como factor de risco para o desenvolvimento de CCR. Este estudo debruçou-se essencialmente no estudo dos genes timidilato sintetase (*TYMS*) e metionina sintetase (*MTR*) em populações com CCR e DC, bem como no padrão nutricional destas populações com particular incidência nos nutrientes envolvidos no ciclo do folato (folato, metionina, vitamina B6, vitamina B12).

Analisando o conjunto de resultados obtidos para os estudos do CCR podemos concluir que quer a *TYMS* quer a *MTR* possuem um papel relevante na susceptibilidade para desenvolver esta patologia, assim como têm destaque no funcionamento do ciclo celular durante o processo oncogénico. Os resultados demonstram que os factores que levam a uma menor disponibilidade

de grupos metil no ciclo de folato (baixos níveis de folato, alteração da actividade de MTR, elevada expressão de TYMS) constituem factores de risco, muito provavelmente por contribuírem para uma desregulação dos níveis de metionina disponível para a metilação do DNA da célula. Demonstram ainda que em células tumorais ocorrem alterações na regulação do ciclo do folato de forma a favorecer a síntese de DNA em detrimento da metilação do mesmo, alterando para isso a expressão dos genes de forma a que o fluxo de grupos metil provenientes do folato sejam encaminhados para a enzima TYMS. O polimorfismo de deleção 6pb da TYMS surge como um factor de diagnóstico e de prognóstico de CCR para a população portuguesa. Dos factores nutricionais analisados apenas o folato aparenta ter um papel relevante na modelação do risco de desenvolver CCR.

Na doença de Crohn (DC) podemos verificar que a homocisteína e o seu metabolismo poderão contribuir para o aparecimento e desenvolvimento da patologia. O aumento da homocisteína poderá ser o responsável por um aumento da resposta auto-imune do organismo, promovendo o aparecimento da DC. O polimorfismo A2756G *MTR* desempenha um papel preponderante como factor de diagnóstico da DC, tendo sido associado pela primeira vez a esta patologia. Tem também um papel importante no desenvolvimento da doença, uma vez que está associado a uma idade de diagnóstico mais baixa, sugerindo assim que o desenvolvimento da doença ocorre de forma mais precoce.

Concluindo, com este estudo pensamos ter contribuído para um melhor entendimento do papel do ciclo do folato no desenvolvimento de CCR e DC, sendo um ponto de partida para futuras investigações que possam revelar cada vez melhor as complexas interacções metabólicas desta via e a sua influência nas patologias estudadas. Do nosso estudo destacamos a importância de uma análise global das várias etapas do ciclo do folato para que se possa compreender a dinâmica que se estabelece no desenvolvimento destas patologias, podendo diversas alterações, quer a nível genético quer a nível nutricional, exercerem efeitos diferentes consoante o estado dos restantes intervenientes do ciclo do folato. Acreditamos que no futuro este estudo permitirá que o conhecimento do ciclo do folato tenha cada vez mais uma relevância fundamental a nível de diagnóstico e terapêutica destas patologias.

## **ABSTRACT**

Colorectal Cancer (CRC) is one of the cancers that have a higher rate of mortality worldwide. In Portugal this pathology is responsible for the deaths of about 3700 people per year, and these numbers increase each year.

Over the past few decades the role of genetic changes in the etiology of oncological pathologies has had an increasingly greater emphasis. The number of studies that evaluate the importance of polymorphisms, mutations, changes in gene regulation and gene interactions in the development of these diseases has increased exponentially. With the increased knowledge of how these changes influence the development of cancer, appeared the first means for genetic diagnostic, leading to a change in the way diagnosis is seen and in the prevention of these diseases. In CRC the hereditary forms with clearly identified genetic changes represent only 5% of cases. There are about 25% representing hereditary forms for which the patterns of genetic changes haven't been established. In this way, studies that will contribute to a greater understanding of the molecular mechanisms responsible for increased susceptibility of individuals to the CRC development are extremely important.

CRC is a multifactorial pathology, where genetic factors interact with environmental factors in the emergence and development of the disease. Thus, it is essential to integrate the study of genetic changes in the environmental context of the individuals under study. In the case of this pathology one of the main environmental factors studied is nutrition. Several studies have been conducted over the past few years in order to understand how the intake of nutrients can influence the development of CRC and how nutrients interact with the individual genetic changes. The folate cycle is one of the metabolic processes where the role of nutrition in interaction with genetic alterations has been studied in recent years. This cross between the study of genetic and environmental changes developed Nutrigenetics.

The set of studies of this thesis aims to increase awareness of the role of changes in genes of the folate cycle, in interaction with nutritional factors and lifestyle, not only in the development of CRC, but also of another pathology of the gastrointestinal tract, Crohn's disease (CD), an inflammatory disease often associated as a risk factor for the development of CRC. This study dealt mainly in the study of genes thymidylate synthase (*TYMS*) and methionine synthase (*MTR*) in populations with CRC and CD, as well as in the nutritional pattern of these populations with particular focus on nutrients involved in the folate cycle (folate, methionine, vitamin B6, vitamin B12).

Analyzing the results obtained for the CRC studies we conclude that either the *MTR* *TYMS* have a relevant role in susceptibility to develop this pathology, and have an important role in the functioning of the cell cycle during oncogenesis. The results show that the factors that lead to a lower availability of methyl groups in folate cycle (low levels of folate, change the activity of *MTR*, high expression of *TYMS*) constitute risk factors, most likely by contribute to a dysregulation of methionine levels available for DNA methylation of the cell. Our results also demonstrate that in tumor cells occur changes in the regulation of the folate cycle in order to promote the synthesis of

DNA, to the detriment of methylation of the same by changing the expression of genes so that the methyl groups from folate are forwarded to the TYMS enzyme reaction. The deletion polymorphism 6bp of TYMS emerges as a diagnostic and prognostic factor of CCR for the Portuguese population. Nutritional factors analyzed only folate appears to have a major role in modulating the risk of developing CCR.

In Crohn's disease (CD) we can check that homocysteine and its metabolism may contribute to the emergence and development of this pathology. Increased homocysteine may be responsible for an increase in the body's autoimmune response, promoting the emergence of CD. The polymorphism A2756G *MTR* plays a leading role as a factor of diagnosis of DC, having been associated with this pathology for the first time. It also has an important role in the development of the disease, since it is associated with a lower diagnostic age, suggesting that the development of the disease occurs earlier.

In conclusion, our study has contributed to a better understanding of the role of folate cycle in the development of CRC and CD, being a starting point for future research that may prove increasingly complex metabolic interactions in this via and its influence on the pathologies studied. In our study we highlight the importance of a comprehensive analysis of the various steps of the folate cycle in order to understand the dynamics that settles in the development of these pathologies, and a number of amendments, whether at the genetic level or at the nutritional level, exercise different effects depending on the stage of the remaining participants in the folate cycle. We believe that in the future this study will allow the knowledge of folate cycle to have increasingly a fundamental relevance at the level of diagnosis and treatment of these diseases.

## **CAPÍTULO 1**

---



## I. INTRODUÇÃO

### 1. CANCRO

O cancro é uma doença crónica responsável por um oitavo das mortes a nível mundial, sendo a segunda causa de morte nos países desenvolvidos e a terceira nos países em vias de desenvolvimento (1, 2). Engloba um conjunto de mais de 100 doenças distintas, com diversos factores de risco e diferentes epidemiologias com origem em células de variados órgãos do corpo humano (3). Este grupo de doenças caracteriza-se por apresentar uma proliferação descontrolada de células anormais que podem ultrapassar os limites do tecido normal e metastizar em órgãos distantes (1, 3, 4). A capacidade de metastizar em outros órgãos distingue os tumores malignos dos benignos (4).

Tem sido sugerido por alguns autores a existência de várias alterações-chave que ocorrem nas células de maneira a originar células tumorais. Tais alterações surgem de forma cumulativa levando a uma perda sucessiva do controlo da divisão e proliferação celular. Essas alterações incluem: resistência à morte celular; sinalização proliferativa; resistência aos inibidores de divisão celular; activação da invasão e metastização; imortalidade replicativa; activação da angiogénese; desregulação do controlo energético da célula; inflamação; impedir a destruição imunológica; instabilidade genómica e mutação (2, 5). O cancro, como doença multifactorial que é, terá no surgimento destas diversas etapas um conjunto de factores externos (alimentação, poluição, tabaco, radiação, infecções) e internos (mutações hereditárias, alterações hormonais, mutações originadas pelo metabolismo), podendo ter uma origem familiar ou esporádica (1, 4).

A identificação de mutações responsáveis pelo desenvolvimento de cancro tem sido objecto de estudo nas últimas décadas. Todo este trabalho resultou na identificação, até ao momento, de cerca de 350 genes com alterações de diversos tipos (substituições, amplificações, deleções, alterações epigenéticas) que se encontram de forma recorrente em células cancerígenas e que apresentam fortes evidências de estarem relacionadas com o desenvolvimento de cancro (6). Os genes identificados demonstram a heterogeneidade e complexidade desta doença uma vez que envolvem diversas vias regulatórias distintas a nível celular (6-10). No entanto nas décadas mais recentes os esforços têm sido direccionados para alterações em genes que confirmam susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores. Vários polimorfismos com penetrância incompleta têm sido identificados como factores de aumento da susceptibilidade de desenvolvimento de doença oncológica, quer como factores isolados quer em interacção com factores ambientais (11-14).

No entanto, e apesar dos diversos estudos efectuados e da enorme quantidade de dados produzida, o número de genes com alterações envolvidas na etiologia do cancro e com aplicações práticas de diagnóstico é muito limitado ainda. Alguns dos exemplos mais conhecidos são os genes *Brca1* (*breast cancer 1*) e *Brca2* (*breast cancer 2*) nos cancros da mama e ovário familiares (15, 16), os genes *Mlh1* (*MutL homolog 1*) e *Mlh2* (*MutL homolog 2*) no cancro colo-rectal familiar (17, 18), o gene *Cdkn2a* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) no melanoma

familiar (19, 20), o gene *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*) na polipose adenomatosa familiar (21) e o gene *p53* (*tumor protein 53*) no síndrome de Li-Fraumeni (22). Mesmo estes casos apenas explicam uma minoria dos casos de cancros familiares. No caso dos genes *Brca1* e *Brca2*, estes apenas estão relacionados com cerca de 30% dos casos com transmissão familiar e uma minoria dos casos esporádicos (15). Assim verifica-se que a etiologia dos diversos tipos de cancro permanece um enigma cuja solução continua incompleta.

## **1.1 CANCRO DO CÓLON E RECTO**

O cancro do cólon e recto (CCR) é um dos cancros com maior incidência e mortalidade a nível mundial (1, 23-25). De acordo com as estatísticas de 2008 da Organização Mundial de Saúde (OMS) o CCR encontra-se em quarto lugar a nível de incidência em ambos os sexos com cerca de 1,2 milhões de casos todos os anos (660 mil nos homens e 560 mil nas mulheres) (25). Cerca de 60% dos casos de CCR encontram-se nos países desenvolvidos com especial incidência na Austrália, Europa e Estados Unidos da América (EUA) (25). A mortalidade a nível mundial é cerca de 600 mil por ano o que corresponde a 8% das causas de morte por cancro, sendo a quarta maior taxa de mortalidade (25). Tal como na incidência a mortalidade apresenta uma taxa maior nos homens (320 mil/ano) do que nas mulheres (290 mil/ano) (25).

Em Portugal o CCR é o cancro com maior incidência em ambos os sexos quando consideradas as localizações comuns (25). De acordo com os dados de 2008 Portugal apresenta cerca de 7 mil casos por ano (16.1% dos casos oncológicos) com uma mortalidade de cerca de 3,7 mil mortes por ano (15,2% das mortes oncológicas) (25). De acordo com as estimativas da OMS Portugal em 2030 terá uma incidência de 9,3 mil casos/ano e uma mortalidade de 5 mil casos/ano por CCR (25). O CCR é assim um dos principais problemas de saúde pública actual e no futuro em Portugal e no mundo (23, 24, 26, 27).

### **Caracterização Clínica e Terapêutica**

O diagnóstico precoce é fundamental de forma a se poder atingir a cura no CCR. No entanto o facto de muitos dos sintomas associados ao CCR serem pouco específicos (fadiga, obstrução intestinal, dor abdominal e rectal, perda de peso, hematemese) leva a um atraso no diagnóstico e consequentemente na eficácia da terapia (28-30), embora haja alguns autores que discordem desta associação (31). Assim, metodologias de rastreio que possibilitem uma maior facilidade de diagnóstico e portanto uma detecção mais precoce do CCR permitiriam atingir uma maior taxa de sobrevivência entre os doentes (32, 33). O diagnóstico molecular perfila-se assim como uma técnica de eleição dado o seu potencial de discriminação, rapidez e fiabilidade de execução, permitindo uma tomada de decisão por parte do clínico mais informada e mais precoce (34, 35). No entanto a avaliação clínica e histológica dos pacientes continua a ter um papel fundamental



nas estratégias de diagnóstico e terapêuticas actualmente, tornando-se assim essencial uma detalhada caracterização destes parâmetros.

Em termos histológicos o CCR caracteriza-se por ter a sua origem em pólipos da mucosa do cólon (36). Os tipos histológicos mais comuns dos pólipos são o hiperplásico e o adenomatoso. Os pólipos hiperplásicos caracterizam-se por um aumento do número de células glandulares com uma diminuição do muco citoplasmático, sem núcleos hipercromáticos, estratificação e atipia (37). Os pólipos adenomatosos apresentam núcleos hipercromáticos, aumentados e dispostos em paliçada (37). Praticamente todos os cancros do cólon e recto derivam de adenomas como pode ser comprovado por várias evidências de origem epidemiológica, clínica e patológica (38-42). Relativamente aos pólipos hiperplásicos a sua ligação ao desenvolvimento de CCR é controversa, havendo no entanto a possibilidade de estar ligado a um aumento do risco embora com um pequeno efeito (43, 44).

Existem diversas classificações para o CCR tendo por base diferentes critérios nomeadamente diferenciação, localização e grau de invasão do tumor. Relativamente à diferenciação o CCR pode ser classificado como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e mal diferenciado, tendo em conta a preservação da arquitectura glandular e das propriedades citológicas. Estima-se que cerca de 20% dos casos de CCR sejam classificados como mal diferenciados, sendo estes os que têm um pior prognóstico (45). Os casos de CCR podem ainda ser classificados relativamente à posição da lesão como proximais (cecum, cólon ascendente, e 2/3 do cólon transversal) ou como distais (1/3 da parte distal do colon transversal, cólon descendente, cólon sigmóide e recto) (46, 47). A classificação de Dukes está relacionada com o grau de invasão por parte do CCR, sendo classificado de A a D. O estadio A corresponde a um CCR limitado à mucosa e submucosa; o estadio B1 o cancro estende-se até à muscular; no estadio B2 o cancro atinge a serosa; no estadio C já existem metástases dos nódulos linfáticos da região; no estadio D existem metástases distantes. Numa metodologia de classificação mais recente do grau de invasão os cancros podem ser classificados relativamente ao grau de profundidade do tumor primário (T), existência de metástases nos nódulos linfáticos próximos (N) e existência de metástases distantes (M), surgindo assim a classificação TNM (tumor; nódulo linfático; metástases) (48).

Em relação à terapêutica no CCR a abordagem está relacionada com o estadio da doença, nomeadamente com a profundidade da invasão, com a existência de nódulos linfáticos afectados e com a existência de metástases à distância. Nos casos de detecção precoce a cirurgia de ablação é normalmente a terapêutica escolhida, podendo ser complementada com quimioterapia adjuvante nos casos em que o CCR se encontre em estadios de desenvolvimento mais tardios (49, 50). Na quimioterapia aplicada o 5-Fluorouracilo (5-FU) tem sido ao longo das últimas décadas o agente mais utilizado, não só no cancro colo-rectal como noutras neoplasias (51). No entanto a administração de 5-FU em bólus tem apenas uma taxa de resposta de cerca de 10%. Assim, de forma a aumentar a eficácia do tratamento, o 5-FU passou a ser administrado em combinação com a Leucovorina (LV), também conhecida por ácido folínico, aumentando a taxa de resposta para cerca de 30% (52, 53). Actualmente o regime terapêutico utiliza uma

combinação de 5-FU/LV com oxiplatina (regime FOLFOX) ou irinotecano (regime FOLFIRI), o que permitiu aumentar não só a taxa de resposta para 60% como também aumentar a sobrevida livre de doença (52, 53). Outro agente quimioterapêutico usado é capecitabina (CAP), um pró-fármaco que é convertido dentro das células tumorais em 5-FU pela timidina fosforilase (54). Este fármaco tem uma taxa de resposta semelhante à do 5-FU/LV e pode também ser usado em combinação com a oxiplatina (54). Os regimes indicados anteriormente podem ainda ser complementados pelo uso de anticorpos monoclonais tais como bevacizumab e o cetuximab, dirigidos respectivamente para o factor de crescimento vascular endotelial e para o receptor do factor de crescimento epidérmico, permitindo assim uma resposta mais eficaz do tratamento quimioterapêutico (55).

### **Factores Genéticos**

Na origem do desenvolvimento de CCR estão envolvidas alterações genéticas variadas (56, 57). Os casos de CCR podem ser divididos em 2 formas: as formas esporádicas e as formas hereditárias (56, 58). As formas esporádicas de CCR representam cerca de 70% dos casos de CCR (58). Apesar de haver uma grande heterogeneidade genética nestes casos podem-se distinguir duas vias de origem tumoral: a via supressora e a via mutadora (58, 59). A via supressora está relacionada com a instabilidade cromossomal, caracterizando-se por um acumular de mutações em genes como *p53* (proteína tumoral P53), *K-ras* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *Apc* e *Dcc* (deletado em cancro colo-rectal) (60, 61). A via mutadora caracteriza-se por um acumular de mutações em genes de reparação *mismatch* (*mismatch repair genes*) (MMR), o que leva a uma instabilidade genética das regiões de microssatélites (60, 61).

Nas formas hereditárias de CCR podemos distinguir os síndromas das formas familiares (56, 57). Os síndromas resultam de mutações em genes de alta penetrância. Existem dois síndromas conhecidos: a polipose adenomatosa familiar e o cancro colo-rectal não associado a polipose também conhecido como síndrome de Lynch. A polipose adenomatosa familiar tem origem em mutações no gene *Apc* nas células da linha germinal, caracterizando-se por um elevado número de adenomas ao longo do cólon (62, 63). O síndrome de Lynch, por seu lado, resulta de mutações em genes MMR em células da linha germinal originando instabilidade nas regiões microssatélites (64, 65). Os síndromas representam apenas 5% dentro dos 30% das formas hereditárias. Os restantes 25% resultam das formas familiares de CCR das quais não se conhecem ainda os mecanismos moleculares de forma clara (66, 67). Sabe-se no entanto que indivíduos com história familiar de CCR vêem o seu risco de desenvolver a doença aumentado em cerca de 15% (68, 69).

### **Factores Ambientais**

Devido à sua origem multifactorial o CCR tem na sua etiologia não só factores genéticos mas também factores ambientais. Estes factores ambientais podem ser de várias ordens, tais como: poluição, radiação, estilo de vida, nutrição entre outros. De todos eles podem-se destacar três factores com maior influência para o desenvolvimento de CCR: Actividade física, obesidade, nutrição (70, 71).

A actividade física tem sido estudada de forma intensiva no que respeita ao seu efeito no desenvolvimento de CCR. De uma forma geral os estudos indicam que indivíduos com uma maior actividade física apresentam uma redução do risco de terem a CCR (72-74). O modo como o aumento da actividade física está relacionado com a diminuição do risco não está completamente desvendado mas poderá estar relacionado com o aumento da velocidade do trânsito intestinal, a diminuição da percentagem de massa gorda corporal e a diminuição da resistência à insulina (73-76).

A obesidade é considerada um factor de risco para o desenvolvimento de CCR, podendo os indivíduos obesos apresentarem um risco 20% superior de desenvolver a doença (77, 78). Os mecanismos associados a este risco aumentado para os indivíduos obesos poderão estar relacionados com processos de inflamação crónica da mucosa intestinal, ou com processos de proliferação descontrolada das células da mucosa intestinal, proporcionada por um aumento dos níveis séricos de insulina (79, 80).

Actualmente a nutrição é vista muito mais como um factor que desempenha um papel determinante na promoção da saúde e prevenção da doença dos indivíduos do que como apenas uma forma de suprir necessidades fisiológicas. É reconhecido também o facto de alterações na dieta de um indivíduo poderem ter repercussões no surgimento de diversas doenças crónicas (81). No que se refere ao CCR a nutrição desempenha um papel fundamental, nomeadamente nos países industrializados (71, 82). Os nutrientes que têm sido mais estudados em termos de relação com o desenvolvimento de CCR são: a fibra, o cálcio, o folato, a gordura animal e o álcool.

O efeito do consumo de fibra no desenvolvimento de CCR é controverso. Diversos estudos apontam para um efeito protector do consumo de fibra no risco de CCR (83-85). No entanto existem variados estudos que demonstram que tal correlação não existe (86, 87). A possível redução de risco derivada do aumento do consumo de fibra poderá estar relacionada com factores como: aumento da velocidade do trânsito intestinal; aumento da fermentação bacteriana, levando a um aumento da produção de butirato que se sabe que inibe o crescimento de células tumorais e induz a apoptose (88).

O papel do consumo de cálcio, através de fontes alimentares, como protector do risco de CCR é também ele controverso. Existem estudos recentes que demonstram a existência desta associação entre o elevado consumo de cálcio e a diminuição do risco de CCR (89, 90). Contudo existem alguns trabalhos anteriores que não apresentam evidências desta protecção (91, 92). A

diminuição do risco por parte do cálcio poderá estar associada a uma prevenção na fase pré-neoplásica ou a um aumento da apoptose de células tumorais (93).

No caso do folato os resultados são também discrepantes mas ainda assim são vários os estudos desde a década de 90 do século XX que demonstraram uma associação inversa entre o consumo de folato e o risco de CCR (94-96). Esta vitamina tem um papel crucial no metabolismo celular uma vez que está envolvida em dois processos fundamentais do ciclo celular: a replicação e a metilação do DNA (97, 98). O folato depois de absorvido é convertido em 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), forma através da qual circula no sangue sendo absorvido pelas células dos diversos tecidos. Dentro das células o 5-MTHF actua como dador dos grupos metilo convertendo-se em tetrahydrofolato (THF). O grupo metilo servirá para a remetilação da homocisteína em metiona, sendo que esta posteriormente dará origem à S-adenosilmetionina (SAM), o dador universal de grupos metilo, essencial para a metilação de DNA e proteínas. Por seu lado o THF formado estará na origem da síntese do nucleótido desoxitimidilato monofosfato (dTMP), essencial para a replicação do DNA, a partir da desoxiuridilato monofosfato (dUMP) (99). Baixos níveis de folato promoverão a hipometilação do DNA levando a um aumento da expressão dos genes, nomeadamente dos oncogenes conduzindo a uma hiperproliferação celular. A hipometilação é ainda responsável por um aumento da instabilidade cromossómica. Os níveis baixos de folato poderão estar também relacionados com o aumento dos níveis de incorporação do uracilo no DNA aumentando assim o número de quebras cromossómicas (98, 100, 101).

Alguns estudos sobre a associação entre o consumo de gordura animal e o risco de desenvolver CCR indicam que o elevado consumo de gordura está relacionado com o aumento de risco de CCR (102, 103). Esta associação parece estar relacionada com o aumento da produção de ácidos biliares devido ao elevado consumo de gordura. Os ácidos biliares em excesso podem promover danos nas membranas das células e posteriormente o desenvolvimento tumoral (104, 105).

São vários os estudos que ligam o consumo de álcool a um aumento do risco de desenvolvimento de CCR. Os processos moleculares na base deste aumento de risco são vários: inibição da enzima metionina sintetase (MTR) e da enzima DNA metilase, diminuindo a disponibilidade de S-adenosilmetionina para a metilação celular (106); diminuição da absorção da vitamina B6, da vitamina B12 e do folato, levando a uma desregulação do ciclo do folato (107); produção de acetaldeído, metabolito carcinogénico, proveniente da oxidação do álcool (108).

## **Inflamação**

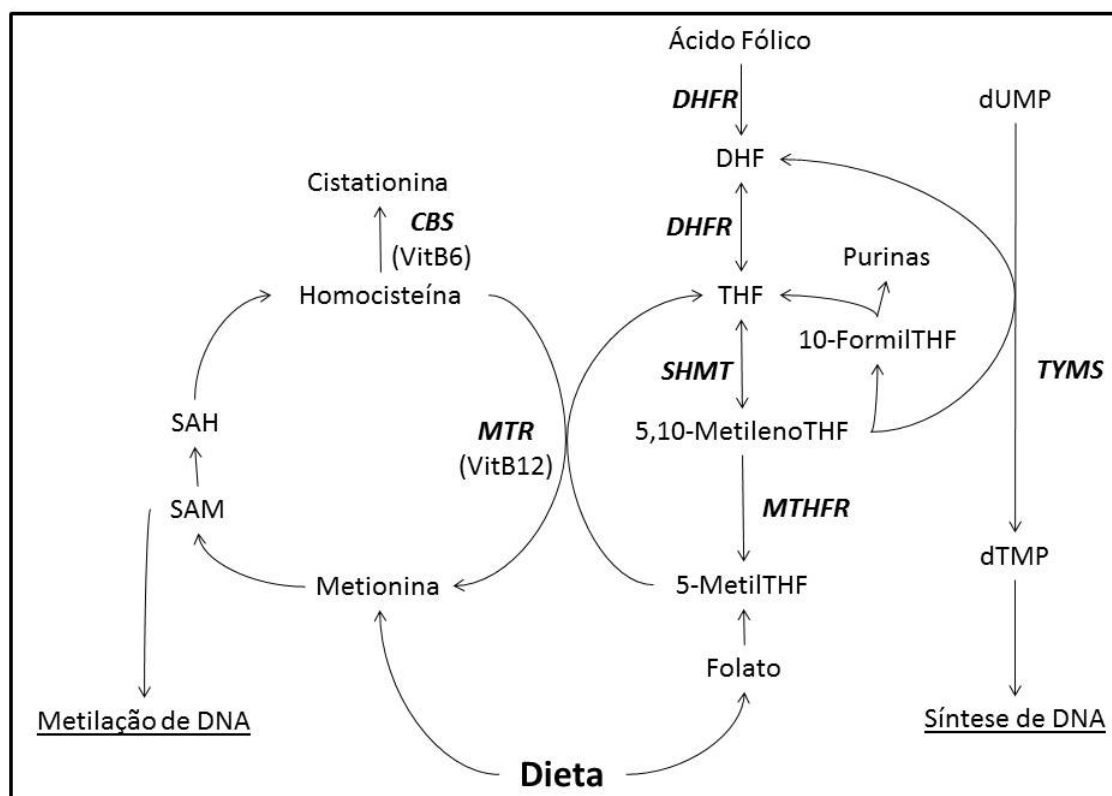
A associação entre inflamação crónica dos tecidos e cancro é já conhecida (109). Muitos dos processos que originam tumores podem ser explicados através de alterações genéticas mas, no entanto, tais alterações não conseguem explicar todos os processos de origem e evolução do tumor (110, 111). Os componentes celulares da resposta inflamatória parecem estar associados

ao processo de tumorigénese (110, 111). Assim a relação entre as doenças inflamatórias do intestino (IBD, do inglês *inflammatory bowel disease*) e o desenvolvimento de CCR tornou-se amplamente aceite (112). A doença de Crohn (DC) é uma IBD crónica que pode afectar o tracto gastrointestinal da boca até ao ânus (113). A DC é resultado de alterações imunológicas ao nível do sistema gastrointestinal resultando numa resposta inflamatória inapropriada (114). Os factores que poderão estar nesta resposta inflamatória podem ter origens diversas tais como: alterações da microflora entérica, dieta e hábitos tabágicos (115). Apesar de apenas 2% dos casos de CCR estarem associados a IBD, o CCR é responsável por cerca de 15% das mortes em pacientes com IBD (116). De salientar ainda que várias das alterações celulares que são encontradas em casos de CCR esporádicos são as mesmas que se encontram em casos de CCR associados a IBD, reforçando desta forma a relação entre estas duas patologias (112).

## **2. CICLO DO FOLATO**

O folato é uma vitamina hidrossolúvel essencial que existe em determinados alimentos nomeadamente frutas e vegetais, assim como na sua forma sintética (ácido fólico) usada em suplementos alimentares (117, 118). O folato participa nalguns dos mais importantes processos a nível celular incluindo a metilação das principais biomoléculas (DNA, RNA, proteínas) e também a replicação do DNA, através da síntese de nucleótidos de purinas e de timidilato (Fig.1) (99). Estes dois mecanismos celulares, nos quais o folato se encontra envolvido, desempenham um papel crucial na manutenção do ciclo de vida normal para as células.

A metilação do DNA, nomeadamente das citosinas, é um acontecimento importante e relativamente comum no genoma humano. Esta modificação ocorre com maior frequência em citosinas que pertençam a dinucleótidos 5'-CpG-3' e ocorre quando o grupo metilo da S-adenosilmetionina é transferido para a citosina dando assim origem à 5-metilcitosina (5-MC) (119). Estudos recentes revelaram que cerca de 4% das citosinas do DNA encontram-se metiladas e que cerca de 68% dos dinucleótidos 5'-CpG-3' se encontram metilados, sendo praticamente a totalidade da metilação (119). A distribuição destes dinucleótidos não é aleatória ao longo do genoma. Eles encontram-se acumulados em regiões denominadas ilhas CpG que por sua vez se encontram normalmente associadas a regiões reguladoras do genoma como por exemplo nas regiões dos promotores de genes (120, 121). A metilação destas regiões reguladoras tem como função principal o silenciamento da transcrição dos genes. O mecanismo através do qual ocorre este silenciamento não está totalmente explicado mas poderá estar associado com a perda de capacidade das proteínas reguladoras se conseguirem ligar às regiões metiladas devido à alteração das citosinas (122). Desta forma o processo de metilação do DNA é um processo fundamental para regular a expressão dos genes e controlar assim toda a actividade celular.



**Figura 1.** Ciclo do Folato (Adaptado de Crider *et al*) (99).

As enzimas encontram-se em negrito e *italico*. CBS (cistationina-β-sintase), DHFR (dihidrofolato reductase), MTR (metionina sintetase), MTHFR (metilenotetrahydrofolato reductase), SHMT (serina hidroximetiltransferase), TS (timidilato sintetase). 5,10-metilenoTHF (5,10 metilenetetrahydrofolato), 5-metilTHF (5-metiltetrahydrofolato), 10-formilTHF (10-formiltetrahydrofolato), DHF (dihidrofolato), dTMP (deoxitimidina monofosfato), dUMP (deoxiuridina monofosfato), SAH (S-Adenosilhomocisteína), SAM (S-adenosilmetionina), THF (tetrahydrofolato), VitB6 (vitamina B6), VitB12 (vitamina B12)

No que se refere à síntese de DNA o folato participa na síntese do timidilato a partir do desoxiuridilato e na síntese de purinas (adenina, guanina) (Fig.1). Este processo é também fundamental para a célula pois todo o processo de replicação do DNA, e a consequente divisão celular, ficará comprometido caso haja um défice destes nucleótidos. No caso particular da síntese do timidilato caso haja um défice deste nucleótido a célula poderá começar a incorporar uracilo no DNA durante a replicação, o que levará a um aumento da instabilidade genómica (123-125). Fica assim demonstrada a importância do folato no metabolismo celular e a importância da melhor compreensão de todas as vias metabólicas que envolvem o processamento desta vitamina e dos seus derivados (Fig.1).

Em condições normais o folato proveniente da dieta é convertido em 5-MTHF, na sua forma monoglutamilada, no intestino e fígado. É nesta forma que o folato circula no sangue de forma a ser absorvido pelos vários tecidos. No entanto, após ser absorvido pelas células o 5-MTHF tem de ser poliglutamilado (2 a 9 resíduos de glutamato) pois apenas esta forma é biologicamente activa. Permite também uma maior retenção do folato nas células dado que a forma monoglutamilada apresenta uma elevada taxa de excreção celular (126). No entanto o 5-MTHF não funciona como um bom substrato da poliglutamato sintetase, a enzima responsável pela glutamilação, tendo que ser previamente convertido em THF através da enzima metionina

sintetase (MTR) (Fig.1). O THF já é facilmente poliglutamilado e portanto consegue ser mais facilmente retido pelas células (99). Quando é ingerido ácido fólico em vez de folato a via seguida pelas células é ligeiramente diferente. O ácido fólico tem de ser convertido em THF para poder integrar o grupo dos folatos celulares tal como o folato obtido na dieta. No entanto o ácido fólico é convertido em dihidrofolato (DHF) e subsequentemente em THF pela enzima dihidrofolato reductase (DHFR) (Fig.1) (127). O THF torna-se assim uma coenzima central no metabolismo do folato e ácido fólico. O THF é convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) pela enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT), uma reacção dependente da presença de vitamina B6 como cofactor. O 5,10-MTHF funciona como ponto comum entre as duas vias principais do ciclo do folato, metilação do DNA e síntese de timidilato, uma vez que é substrato quer para a enzima timidilato sintetase (TYMS) quer para a enzima metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR) (Fig.1). A enzima MTHFR irá converter o 5,10-MTHF em 5-MTHF que é o substrato utilizado pela enzima MTR para remetilizar a homocisteína em metionina. A metionina irá posteriormente dar origem a SAM, o dador universal de grupos metil e portanto responsável pela metilação do DNA entre outros processos (128-130). Caso o 5,10-MTHF seja utilizado como substrato pela enzima TYMS irá dar origem a dTMP a partir de dUMP. Este processo irá dar origem a um nucleótido (timina) essencial para a replicação e reparação do DNA. Assim verifica-se que a competição entre as enzimas MTHFR e TYMS pelo mesmo substrato poderá desequilibrar o funcionamento do ciclo do folato dando lugar a um favorecimento da via da metilação ou da síntese de timidilato. Todas estas reacções do ciclo do folato ocorrem no citoplasma. No entanto para que ocorra a síntese de purinas é necessário haver a intervenção de reacções que ocorrem nas mitocôndrias (131). O THF formado no citoplasma pode entrar nas mitocôndrias onde dá origem ao formato (132, 133). O formato depois de sintetizado é transportado para o citoplasma onde através da sua condensação com o THF dá origem a 10-formiltetrahidrofolato (10-formilTHF) que irá ser o substrato para a síntese das purinas (Fig.1) (134, 135). Existem também algumas evidências de que parte da via do folato, nomeadamente a síntese de nucleótidos, possa ocorrer no núcleo, embora nunca tenha sido comprovada a existência da via por completo (136, 137). Para além do folato e do ácido fólico existem outros nutrientes obtidos a partir da alimentação que são importantes para o funcionamento deste ciclo. Os dois nutrientes com maior destaque são a vitamina B6 e a vitamina B12. A vitamina B6 funciona como cofactor para a enzima SHMT e a vitamina B12 funciona como cofactor para a enzima MTR (Fig.1) (99).

Níveis baixos de folato têm sido associados a diversas patologias, tais como: vários cancros, doenças cardiovasculares, doenças neuronais (138-140). O processo pelo qual estes baixos níveis de folato levam a um aumento de risco para desenvolver estas patologias não está totalmente esclarecido. Uma hipótese será devido ao facto de baixos níveis de folato levarem a uma reduzida produção de timidilato e portanto durante o processo de replicação serão incorporados uracilos no DNA levando a um aumento da frequência de quebras cromossómicas (140, 141). Outro mecanismo possível será através de baixos níveis de metilação devido a uma produção insuficiente de SAM o que levará a uma hipometilação do DNA celular. Esta

hipometilação levará a uma desregulação da transcrição de diversos genes, o que será particularmente grave no caso da activação de oncogenes (142-145). A hipometilação do genoma é aliás uma característica principal das células cancerígenas (146, 147). No caso das doenças cardiovasculares e das doenças neuronais o efeito dos níveis baixos de folato poderá estar relacionado com o aumento da homocisteína, originando hiperhomocisteinemia (148). Vários estudos têm associado os elevados níveis de homocisteína com o risco para desenvolver doenças cardiovasculares e neuronais entre outras, não estando o mecanismo pelo qual tal poderá acontecer totalmente esclarecido (148). A homocisteína é metilada em metionina pela enzima MTR, tendo como substrato o 5-MTHF. O 5-MTHF tem origem, entre outras hipóteses, no folato proveniente da alimentação. Assim, baixos níveis de folato levariam a baixos níveis de 5-MTHF, o que teria como consequência uma menor capacidade de metilação da homocisteína resultando na sua acumulação (128, 129).

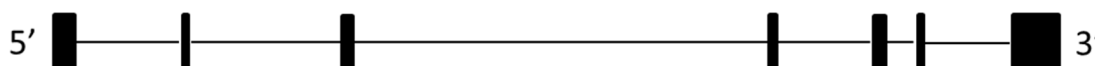
Desta forma podemos comprovar a importância do ciclo do folato, e das enzimas que o constituem, para o metabolismo da célula. Assim, torna-se essencial aprofundar o conhecimento do funcionamento destas enzimas e dos genes que lhe estão na origem para que possamos melhor compreender o funcionamento do ciclo e a forma como a sua desregulação poderá estar na origem de algumas das patologias anteriormente referenciadas. Neste estudo destacaremos dois genes em particular que de seguida iremos caracterizar: timidilato sintetase e metionina sintetase.

## **2.1 TIMIDILATO SINTETASE**

### ***Estrutura do Gene e Proteína***

A enzima timidilato sintetase (5,10-metilenotetrahidrofolato:dUMP C-metiltransferase; EC 2.1.1.45) catalisa a metilação redutiva do dUMP, utilizando o 5,10-MTHF como cofactor, dando origem a dTMP (149, 150).

O gene que codifica para a enzima TYMS encontra-se no braço curto do cromossoma 18 com a seguinte localização: 18p11.32 (151). O gene é constituído por sete exões com tamanhos entre os 72 e 250 pares de bases (pb), os seus seis intrões têm tamanhos que variam entre 507 e 6271pb, sendo que o gene estende-se por uma extensão de 23 kilobases (kb) (Fig.2) (152).



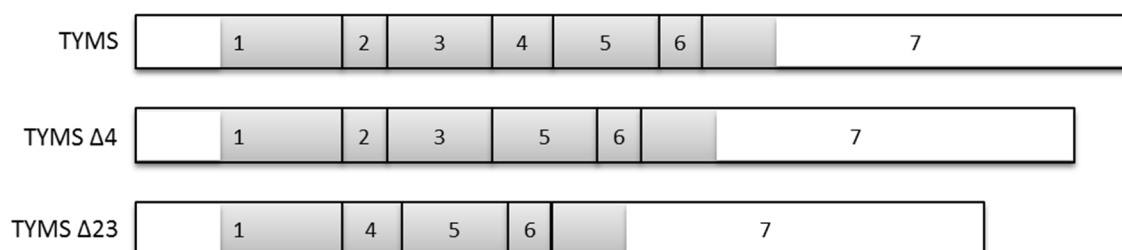
**Figura 2** – Esquema do gene da timidilato sintetase humana. As caixas a preto representam os exões, as linhas representam os intrões.

A região 5' a montante do gene caracteriza-se por um elevado conteúdo GC (cerca de 74%) entre -1pb e -316pb, havendo também uma região com elevado conteúdo de purinas (A+G) (cerca de 80%) entre -106pb e -159pb (152). Esta região caracteriza-se ainda por uma ausência



dos sinais canónicos de transcrição: *TATA box*, *CAAT box* e *GC box* (152). Apesar da não existência destas regiões canónicas sabe-se que a região promotora do gene se encontra até 370pb a montante do local de iniciação da transcrição (152). Foram identificados dois locais com actividade promotora da transcrição, um motivo de ligação da proteína Sp1 e uma *CACCC box* (152-154). Para além destas sequências que têm um papel de activação da transcrição, foram também identificadas sequências que exercem um controlo repressivo e que se localizam entre as duas sequências anteriores. De todos estes motivos o que parece ter uma maior relevância é o local de ligação da proteína Sp1 (152-154). Relativamente ao local de iniciação da transcrição foram identificados vários na região -180pb e -160pb a contar do codão de iniciação (152). A região 3' a jusante do gene caracteriza-se pela existência de dois sinais de poliadenilação distintos e que se encontram separados por 288pb (152).

O RNA mensageiro (mRNA) canónico do gene *TYMS* contém 1662pb com uma região 5' não traduzida (UTR, do inglês *untranslated region*) com 139pb e uma região 3'UTR com 581pb (Fig.3) (152). A região 5'UTR caracteriza-se pela existência de uma repetição em *tandem* de uma sequência de 28pb entre -97pb e -8pb, sendo no entanto o número de repetições variável. Existe também uma repetição invertida entre -139pb e -112pb com cerca de 75% de homologia com as outras repetições (Fig.3). Isto proporciona ao mRNA da *TYMS* a possibilidade de realizar um *loop* na região 5'UTR que poderá afectar as taxas de tradução desse mRNA (152). Foram ainda identificadas duas regiões na porção codificante do mRNA dois locais de ligação da *TYMS* ao seu próprio mRNA. Estes locais encontram-se entre 75-110pb e 434-634pb (155). Existem descritos dois transcritos alternativos para o gene *TYMS*. Um deles não contém os exões 2 e 3 (*TYMS* Δ23), o outro não contém o exão 4 (*TYMS* Δ4) (Fig.3) (156). Estes transcritos alternativos têm uma estrutura que possibilita a produção de proteínas, embora estas nunca tenham sido detectadas em meio celular.

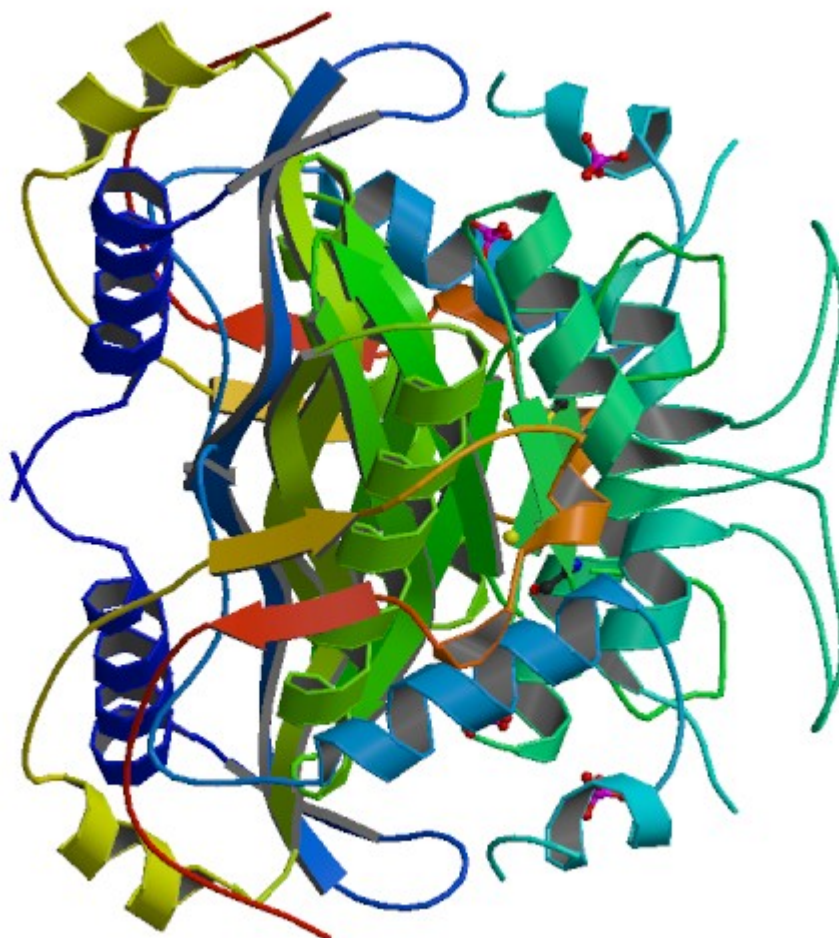


**Figura 3** – Esquema dos transcritos possíveis do gene timidilato sintetase. A numeração representa os exões presentes em cada transcrito. As regiões a branco representam as *UTR*.

O gene da *TYMS* é um dos mais conservados em termos evolutivos, não só entre os Eucariotas mas também entre Eucariotas e Procariotas, sendo que o gene humano e o de *E. coli* apresentam cerca de 53% de homologia (157).

A proteína produzida pela *TYMS* tem 316 aminoácidos (aa) com um tamanho correspondente de 35 kDa. (158, 159). Esta enzima tem uma localização generalizada na célula, encontrando-se presente essencialmente no citoplasma mas também no núcleo e na mitocôndria. É uma

proteína homodimérica obrigatória, sendo a interface de ligação entre os dímeros composta por 6 folhas  $\beta$ . O centro activo localiza-se numa cavidade criada entre os dois dímeros (Fig.4) (158).



**Figura 4** – Diagrama cristalográfico do dímero da enzima timidilato sintetase obtido por difracção de raio-x com uma resolução de 1,8 Å (PDB: 1YPV) (160).

Os aminoácidos Argina (Arg)178 e Arg218 desempenham um papel fundamental quer na dimerização quer na actividade da proteína. A sua substituição resulta numa perda da actividade da TYMS (158). Estão identificados outros aminoácidos importantes para actividade da enzima nomeadamente a Cisteína (Cys) 146 que é essencial para a ligação ao substrato dUMP (161). A ligação do substrato e cofactores e a libertação dos produtos segue uma ordem específica à enzima. O primeiro a ligar-se é o dUMP sendo seguido do 5,10-MTHF. Na libertação o primeiro a abandonar a enzima é o dTMP seguido do DHF (150). A enzima apresenta também a capacidade de ligação ao mRNA embora estes domínios não estejam ainda bem definidos.

### **Regulação da Expressão e Actividade**

A expressão da *TYMS* é altamente regulada quer a nível transcricional, quer a nível pós-transcricional. Em termos de transcrição a expressão da *TYMS* encontra-se aumentada em células proliferativas atingindo o seu pico de acumulação celular nas fases G1 e S (162-164). Este aumento da enzima na fase S estará relacionado com a necessidade de nucleótidos por parte da célula para realizar a replicação durante a fase S (162-164). O aumento da transcrição durante o ciclo celular é regulado pela cinase dependente de ciclinas 4 (CDK4, do inglês *cyclin-dependent kinase 4*) (165). Também a p53 parece controlar a expressão da *TYMS*. A p53 efectua uma inibição da transcrição do gene *TYMS* fazendo com que as células tenham maior dificuldade em prosseguir para a replicação, impedindo assim a divisão celular (166, 167). Para além desta variação dependente do ciclo celular a *TYMS* parece apresentar uma variação circadiana dependente do número de horas de luz a que um indivíduo esteja sujeito (168, 169).

A presença de intrões no gene da *TYMS* também desempenha um papel fundamental na regulação da sua expressão. Demonstrou-se que para o gene *TYMS* manter o seu padrão de expressão durante o ciclo celular é essencial a presença de alguns intrões, principalmente do intrão 1 (170-173). As experiências efectuadas demonstram que é o próprio processo de splicing dos exões, e não a existência de sequências reguladoras dentro dos intrões, que controla o padrão de expressão. O processo pelo qual tal acontece parece estar relacionado com a acumulação de mRNA não processados que serão processados durante a fase S levando a um aumento da expressão da proteína (173).

Uma outra forma de regular a expressão da *TYMS* é através da regulação *anti-sense*. Foi identificado um gene, *rTYMS*, que é sintetizado a partir da mesma região genómica do gene *TYMS* mas a partir da cadeia inversa, originando assim um RNA complementar do mRNA da *TYMS*. A expressão deste gene está relacionada com uma quebra da expressão da *TYMS* por degradação do mRNA. Este aumento dos níveis de *rTYMS* e diminuição dos níveis de *TYMS* encontram-se associados essencialmente a células não-proliferativas (174-176).

A regulação da expressão pode ainda ser realizada através da regulação da tradução do mRNA. A regulação da tradução é feita através da ligação da proteína *TYMS* a locais específicos do seu próprio mRNA. Vários estudos indicam a capacidade da *TYMS* se ligar a ácidos nucleicos (177). Ao ligar-se ao seu próprio mRNA impedindo a sua tradução a *TYMS* realiza um processo de auto-regulação negativa (178). O domínio ligação ao mRNA coincide com a localização do centro activo da enzima, fazendo com que exista uma competição entre a ligação do substrato natural da enzima (dUMP) e a ligação do mRNA. A enzima apresenta uma maior afinidade para o substrato o que leva a que na presença deste não haja inibição da tradução do mRNA (178). No entanto a *TYMS* não se liga apenas ao seu próprio mRNA. Alguns trabalhos têm demonstrado a ligação desta proteína a diversos mRNA incluindo os da p53 e c-myc, dois genes supressores de tumores, impedindo a sua tradução (177, 179-181).

## Polimorfismos

Existem diversos polimorfismos descritos para o gene da TYMS. Iremos aqui abordar alguns dos polimorfismos mais significativos deste gene.

Um dos polimorfismos mais estudados do gene da TYMS é a repetição em *tandem* de uma sequência de 28pb (28pbrpt) (CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG) na região 5'UTR do mRNA. O número mais comum de repetições varia entre 2 (2R) e 3 (3R) mas já foram encontrados indivíduos com 9 repetições. A frequência deste polimorfismo apresenta variações entre diferentes populações. Nas populações da Ásia o alelo de 3 repetições apresenta uma frequência cerca de 80%, em populações caucasianas 60% e em populações africanas 50% (182-185). Existem alguns dados contraditórios relativamente à função deste polimorfismo. Alguns estudos apontam para uma influência do número de repetições na quantidade de mRNA da TYMS, sendo o alelo das 3 repetições responsável por uma maior expressão (186, 187). Outros estudos indicam no entanto que a influência do número de repetições é ao nível da tradução e não da transcrição, mostrando que o alelo com 3 repetições apresenta uma maior taxa de tradução (188, 189). Existem ainda autores que sugerem que o alelo influencia quer os níveis de transcrição, quer os níveis de tradução (190). O mecanismo para explicar o aumento da taxa de transcrição poderá estar relacionado com a existência de um local de ligação de factores de transcrição (USF-1) em cada repetição, enquanto o aumento da tradução poderá estar relacionado com a formação de *loops* na região 5'UTR do mRNA devido à presença das repetições, alterando assim a taxa de tradução (152, 186-191). Embora a níveis diferentes, os estudos parecem apontar para uma influência deste polimorfismo na expressão da TYMS, sendo o alelo 3R responsável por um aumento da expressão. Um dado curioso acerca do polimorfismo das repetições em *tandem* é a sua existência noutros primatas, embora nestes o número de repetições seja monomórfico apresentando apenas o alelo 3R (192).

Outro polimorfismo muito estudado é uma deleção de 6pb (6pbdel) (TTAAAG/-), que se localiza na região 1494pb na 3'UTR do mRNA. A 6pbdel está associada a uma diminuição da estabilidade do mRNA do gene da TYMS e portanto a níveis mais baixos de mRNA celular (187, 190, 193, 194). A diminuição da estabilidade é devido a uma maior afinidade da proteína AUF1 para o alelo com a deleção. Esta proteína é responsável por promover o decaimento das moléculas de mRNA e deste modo o alelo com a deleção fica associado a uma menor estabilidade do mRNA (194).

Existem outros polimorfismos dentro das repetições da região 5'UTR. Um desses polimorfismos é a existência de uma inserção de 6 nucleótidos dentro da segunda repetição do alelo 3R (CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTccccgCCCG) (191, 195). O papel desta inserção não é conhecido. Para além desta inserção existe ainda uma substituição do 12º nucleótido (G/C) das repetições (195-199). No alelo 2R esta alteração ocorre na primeira das repetições, no alelo 3R ocorre na segunda repetição. Este polimorfismo reduz a taxa de expressão do mRNA da TYMS uma vez que altera a sequência de ligação do factor de transcrição USF-1 (*upstream stimulatory factor 1*) (196-199).

### **Patologias Associadas**

Existem variados estudos que relacionam a enzima TYMS com diversas patologias. A maioria destes estudos incide sobre patologias da área oncológica. Os estudos incidem essencialmente sobre a análise da influência dos polimorfismos ou da expressão da TYMS como factores de risco para o desenvolvimento da patologia, ou como factores de influência para o tratamento da mesma. Iremos analisar alguns exemplos dos estudos efectuados nesta área, separando os estudos por polimorfismo e por expressão do gene.

Em relação ao polimorfismo 28pbrpt têm sido elaborados diversos estudos em vários tipos de cancro. Os resultados têm sido muito variáveis consoante o tipo de cancro estudado e muitas vezes dentro do mesmo tipo cancro existem trabalhos com resultados contraditórios. Alguns estudos têm associado o alelo 3R como factor de risco, quando comparado com o alelo 2R, para o desenvolvimento de alguns tipos de cancro, como factor de resposta à terapêutica ou como factor de risco para a sobrevivência, nomeadamente em cancro gástrico e em leucemias (200-202). Noutros estudos verifica-se, no entanto, um resultado inverso apresentando o alelo 2R um risco maior para o desenvolvimento de determinados tipos de cancro, nomeadamente em cancro da mama e gástrico (203-206). Um dado curioso de alguns destes resultados é o facto de esta associação se encontrar principalmente em indivíduos asiáticos e não em indivíduos caucasianos (205). Este tipo de resultados demonstra que embora haja um papel importante do polimorfismo, o *pool* genético da população tem um papel igualmente importante, demonstrando assim a importância de estudos populacionais em diferentes regiões do globo.

No que se refere ao estudo do polimorfismo da região 3'UTR 6pbdel os resultados são igualmente variáveis. Alguns estudos destacam um papel de aumento de risco para o alelo del principalmente em cancro gástrico (201, 205, 207). Outros autores apresentam resultados onde o alelo del apresenta uma diminuição do risco de desenvolver cancro gástrico, pulmonar ou hepático entre outros (202, 208-211). Alguns estudos estudaram a associação entre os dois polimorfismos em associação mas mesmo assim os resultados parecem variar havendo situações em que a combinação 3R/del apresenta maior risco e noutros casos é outra combinação de alelos a de maior risco de desenvolvimento do cancro (201, 212).

Relativamente à expressão do gene TYMS os resultados são mais consistentes. Uma elevada expressão do gene quer ao nível do mRNA quer ao nível da proteína está associada a vários problemas relacionados com patologias oncológicas. Alguns estudos associam uma elevada expressão do gene da TYMS com a transformação neoplásica das células e com uma progressão mais rápida dos tumores, chegando mesmo a ser sugerida a classificação do gene TYMS como um oncogene (213-218). Para além disso alguns trabalhos demonstram ainda um aumento da resistência à quimioterapia em doentes que apresentam uma maior expressão do gene TYMS nas células tumorais (219-222).

Analisando especificamente os estudos que avaliaram a influência dos polimorfismos da TYMS no cancro colo-rectal verificamos que os resultados não são tão díspares como nas outras

patologias. Ainda assim são poucos os trabalhos que encontram associações estatisticamente significativas e muitas vezes a associação encontrada relaciona aspectos diferentes da patologia com o polimorfismo. Em relação ao polimorfismo 28pbrpt os estudos que encontraram associações estatisticamente significativas apresentam o alelo 3R como sendo um factor de risco (223-227). No entanto os diferentes estudos apresentam diferentes riscos. Alguns apresentam risco para desenvolvimento da doença embora num o resultado apenas se verifique nas mulheres (225, 227). Outros apresentam o alelo 3R associado a uma menor sobrevivência e pior resposta a terapia (223, 224, 226, 227). Assim, são poucos os estudos que demonstram uma clara associação entre o polimorfismo 28pbrpt da região 5'UTR e o desenvolvimento do CCR, embora todos os resultados pareçam demonstrar que de facto este polimorfismo tem um papel importante nesta patologia.

Em relação ao polimorfismo da região 3'UTR parece haver um pouco mais de contradição nos resultados. Existem artigos que referem o alelo del como sendo um factor de risco para o desenvolvimento de CCR (225). Outros estudos apontam este alelo como sendo um factor protector, embora para diferentes parâmetros, incluindo risco de desenvolver CCR, risco de evolução da doença, resposta à quimioterapia (227-229). Ainda mais do que no caso do polimorfismo anterior os resultados mostram uma grande variação no possível papel deste polimorfismo no desenvolvimento de CCR.

Foram feitos alguns estudos relativamente a estes polimorfismos e a sua associação com o desenvolvimento de adenomas no cólon. Os resultados mostram um menor risco para os indivíduos com o alelo del do polimorfismo 6pbdel (230). No caso do polimorfismo da 28pbrpt não foi encontrada qualquer associação por si só mas quando analisado em conjunto com o consumo de folato verifica-se um menor risco para indivíduos homozigóticos 3R com elevado consumo de folato e um maior risco para indivíduo homozigóticos 2R com elevado consumo de folato (231).

No estudo da relação entre a expressão do gene *TYMS* e o risco para o desenvolvimento do CCR os estudos apresentam resultados mais consensuais do que no estudo dos polimorfismos. Vários estudos demonstram a expressão do gene *TYMS* pode ser um bom factor de diagnóstico e de sobrevivência da doença. Uma maior expressão do gene está associada a um maior risco de vir a ter CCR e a um menor tempo de sobrevivência à doença (232-237). A grande maioria dos trabalhos relaciona a expressão do gene *TYMS* com a resposta aos agentes quimioterapêuticos. De uma forma geral, uma maior expressão do gene relaciona-se com uma pior resposta à quimioterapia cujo alvo seja o gene *TYMS* (238-243).

**Tabela 1 – Resumo dos estudos efectuados sobre os polimorfismos da *TYMS***

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Tipo de Cancro</b>	<b>Resultado</b>
<b><i>TYMS 28pb rpt</i></b>			
Villafranca <i>et al</i>	2001	Rectal	2R/2R com maior taxa de sobrevivência livre de doença
Marsh <i>et al</i>	2001	Colo-rectal	2R/2R com maior taxa de sobrevivência e melhor resposta a quimioterapia
Iacopetta <i>et al</i>	2001	Colo-rectal	2R/2R com maior taxa de sobrevivência
Pullacart <i>et al</i>	2001	Colo-rectal	2R/2R com melhor resposta a quimioterapia
Iacopetta <i>et al</i>	2001	Colo-rectal	2R/2R e 2R/3R com maior taxa de sobrevivência
Che <i>et al</i>	2003	Colo-rectal	2R/2R menor risco de desenvolver cancro colo-rectal
Hishida <i>et al</i>	2003	Linfoma	2R/2R e 2R/3R com maior risco de desenvolver linfoma
Yim <i>et al</i>	2010	Gástrico	2R/2R maior risco de desenvolver cancro gástrico
<b><i>TYMS 6pb del</i></b>			
Gao <i>et al</i>	2004	Gástrico e esofágico	del/del associado a hábitos tabágicos apresentam risco para ambos os tipos de cancro
Shi <i>et al</i>	2005	Pulmonar	6bp/del e 6bp/6bp apresentam risco de desenvolver cancro pulmonar
Lu <i>et al</i>	2006	Gástrico	del/del e 6bp/del melhor resposta a quimioterapia
Zhai <i>et al</i>	2006	Mamário	del/del apresenta maior risco de desenvolver cancro mamário
Akisik <i>et al</i>	2007	Mamário	del apresenta menor risco de desenvolver cancro mamário
Fernandez-Contreras <i>et al</i>	2010	Colo-rectal	del/del apresenta menor risco
<b><i>28pb+6pb</i></b>			
Zhang <i>et al</i>	2004	Gástrico e esofágico	Haplótipo del/2R apresenta menor risco para ambos os tipos de cancro
Graziano <i>et al</i>	2004	Gástrico	Haplótipo del/3G apresenta um maior risco de desenvolver cancro gástrico
Dotor <i>et al</i>	2006	Colo-rectal	Haplótipo 3R/del apresenta maior taxa de sobrevivência
Curti <i>et al</i>	2007	Cólon	1 ou 2 alelos variantes em ambos os polimorfismos apresentam um risco reduzido para cancro do cólon positivo para <i>p53</i>
Fernandez-Contreras <i>et al</i>	2010	Colo-rectal	3Rdel/3Rdel apresenta maior risco de desenvolver cancro colo-rectal

## **Inibidores**

Devido ao seu papel fundamental na reparação e replicação do DNA, fornecendo a única forma de sintetizar *de novo* o nucleótido timidina, a TYMS desde cedo se tornou num alvo apetecível para o desenvolvimento de agentes quimioterapêuticos. O objectivo é limitar o crescimento das células tumorais retirando-lhes a sua única fonte de um nucleótido essencial para a replicação e consequentemente para a divisão celular.

Os inibidores da enzima TYMS podem-se dividir em dois grupos: fluoropirimidinas e antifolatos (244-246). O primeiro grupo inibe a enzima competindo com o dUMP, substrato natural da TYMS, pelo local de ligação (246). Neste primeiro grupo um dos inibidores que se destaca é o 5-FU. Este composto é metabolizado dentro da célula em 5-Fluorodesoxiuridina monofosfato (5-FdUMP) que se irá ligar à TYMS inibindo-a devido ao impedimento da ligação do substrato dUMP. A TYMS não consegue metabolizar o 5-FdUMP ao contrário do que acontece com o dUMP ficando desta forma impedida de proceder às suas funções normais. Para além desta acção o 5-FU tem também a capacidade de se incorporar nos ácidos nucleicos amplificando assim o seu potencial efeito aumentando a instabilidade celular (246). O 5-FU é um agente quimioterapêutico usado há mais de cinco décadas. Desde a sua introdução como agente terapêutico o modo como o 5-FU é administrado tem vindo a sofrer alterações de modo a obter resultados cada vez mais satisfatórios. Existem três formas de modular a eficácia do 5-FU: modo de administração; uso de outros agentes para modular a sua acção; uso de pró-fármacos (246). Em relação ao modo de administração este fármaco pode ser administrado em *bolus* ou em perfusão. No entanto os efeitos serão diferentes consoante o modo de administração. Numa administração em *bolus* o 5-FU tem um maior efeito ao nível da incorporação no RNA, enquanto que numa administração em perfusão o efeito incidirá essencialmente na inibição da enzima TYMS (246). No que se refere à modulação da acção utilizando em simultâneo outros agentes a utilização da leucovirina é a mais recorrente. A leucovirina faz aumentar a taxa de resposta do 5-FU para o dobro, tendo no entanto o efeito negativo de aumentar a toxicidade nas células normais, estabilizando a ligação do 5-FU à TYMS (246). O uso de pró-fármacos tem vindo a ser cada vez mais usual apresentando muitas vantagens quando comparada com a administração directa de 5-FU. Dois dos pró-fármacos mais usuais no tratamento do CCR são a Capecitabina e o S-1 (246). A Capecitabina é um pró-fármaco que é metabolizado em 5-FU dentro das células. Apresenta diversas vantagens como por exemplo a maior especificidade tumoral uma vez que é mais metabolizada dentro destas células do que em células dos tecidos normais, menores efeitos adversos como a diarreia, melhor absorção intestinal entre outros (246).

O outro grupo de inibidores da TYMS, antifolatos, liga-se à enzima por competição com o substrato 5,10-MTHF, sendo esta ligação estabilizada e potenciada pela ligação simultânea da dUMP (244-246). Estes inibidores apresentam a vantagem de inibirem mais especificamente a TYMS do que as fluoropirimidinas não provocando efeitos noutras vias metabólicas que poderiam diminuir a eficácia do fármaco. Alguns dos antifolatos mais importantes são o Raltitrexed, o Nolatrexed e o ZD9331 (244-246).



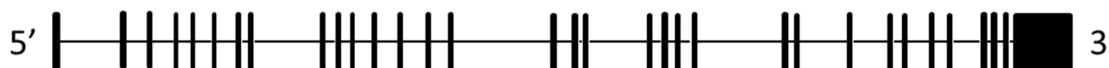
O estudo dos factores de resistência aos diferentes inibidores da *TYMS* têm sido amplamente estudados no sentido de tentar criar metodologias terapêuticas apropriadas para cada indivíduo. Os factores que até ao momento têm demonstrado estar relacionados com mecanismo de resistência aos inibidores são os polimorfismos da *TYMS* e a expressão do gene. No entanto os resultados em relação aos polimorfismos têm sido algo discrepantes. Alguns estudos referem que os indivíduos que apresentam o alelo del do polimorfismo 6pbdel e o alelo 2R do polimorfismo 28pbprt do gene *TYMS* respondem de forma mais favorável à quimioterapia com 5-FU (247, 248). Outros autores no entanto encontram resultados que sugerem uma associação inversa (249, 250). Relativamente à expressão do gene os resultados são mais consensuais demonstrando haver uma pior resposta ao tratamento por parte dos indivíduos que apresentem uma maior expressão da *TYMS* (251-254). Curiosamente um mecanismo de resistência à inibição é provocado pela própria inibição da *TYMS*. Devido à sua inibição, nomeadamente pelo 5-FU a *TYMS*, deixa de conseguir regular a tradução do seu próprio mRNA. Assim, após a administração do 5-FU verifica-se um aumento da expressão da *TYMS* levando a um aumento da resistência ao tratamento quimioterapêutico (252-254).

## 2.2 METIONINA SINTETASE

### *Estrutura do Gene e Proteína*

A enzima metionina sintetase (N-5-metiltetrahydrofolato homocisteína metiltransferase; EC 2.1.13) catalisa a reacção de transferência do grupo metil do 5-MTHF para a homocisteína dando origem a metionina. Neste processo a cobalamina (vitamina B12) é utilizada pela enzima como cofactor. Em termos celulares este processo de produção de metionina é extremamente importante pois a metionina está na origem da SAM que é o principal dador de grupos metil para a metilação de ácidos nucleicos e proteínas na célula (255-257).

O gene que codifica para a MTR encontra-se localizado em 1q43 e é composto por 33 exões com tamanhos entre os 60pb e 432pb com excepção do exão 33 que tem 6424pb. Os 32 intrões têm tamanhos muito variáveis que podem ir de 310pb a 11744pb (Fig. 5) (255-257).



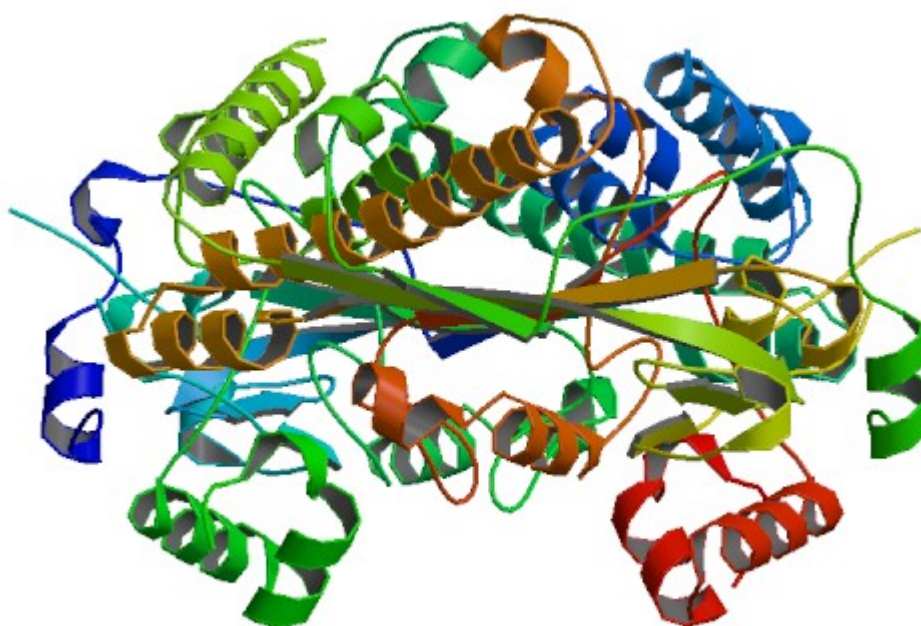
**Figura 5** - Esquema do gene da metionina sintetase humana. As caixas a negro representam os exões, as linhas representam os intrões.

A região a montante do gene caracteriza-se pela ausência de uma *TATA box*. Existem no entanto várias possíveis sequências promotoras nessa região: uma sequência *E box* de -125pb a -120pb; duas sequências *CAAT box* de -103pb -97pb e -72pb a -66pb; uma *GC box* de -55pb a -46pb. Esta é uma característica comum entre os genes *housekeeping* (255, 257).

O mRNA produzido pelo gene tem aproximadamente 10kb com uma região 5'UTR de 394pb e uma região 3'UTR de aproximadamente 6,3kb. A região 3'UTR apresenta uma sequência de poliadenilação canónica e uma cauda poli-A curta. Este mRNA é expresso em todos os tecidos apresentando uma maior expressão no fígado, músculo esquelético e cardíaco e no pâncreas (255, 257).

A proteína da MTR é constituída por 1265aa com uma massa molecular de 140kDa. Esta proteína é monomérica embora existam resultados que mostram que a proteína MTR da placenta forme heterodímeros. A MTR é uma proteína que apresenta uma elevada homologia com as proteínas de *E. coli* e *C. elegans* (55% e 64% respectivamente), não sendo esta uma característica muito comum entre proteínas metabólicas (255, 257).

A proteína contém quatro domínios de ligação diferentes. O primeiro domínio na região N-terminal (1-353aa) é responsável pela ligação e activação da homocisteína por parte da enzima. Esta região cataliza a transferência do grupo metil da metilcobalamina para a homocisteína. O segundo domínio compreende a região entre o aa 354 e o aa 649. Este domínio é o local de ligação ao 5-MTHF catalisando a transferência do grupo metil para a cobalamina. Entre 650-896 aa encontra-se o domínio de ligação à cobalamina e entre 897-1227 aa localiza-se o domínio de ligação para a S-adenosilmetionina, necessária para activação da metionina sintetase (Fig. 6) (258-262).



**Figura 6** - Diagrama cristalográfico do domínio de activação da enzima metionina sintetase obtido por difracção de raio-x com uma resolução de 1,8 Å (PDB: 202K) (261)

### **Regulação da Expressão e Actividade**

A regulação da metionina sintetase é realizada quer ao nível da sua expressão quer ao nível da modelação da sua actividade. Em termos de controlo da expressão da MTR os mecanismos são essencialmente pós-transcricionais (263-265). Um dos mecanismos conhecidos é o aumento da taxa de tradução dos mRNA por acção da cobalamina (264, 265). Foi descoberta uma sequência IRES (do inglês *internal ribosome entry site*) cuja eficácia é aumentada pela ligação de um complexo proteico que envolve a cobalamina (265). Deste modo um aumento da cobalimina levará a um aumento da taxa de tradução do mRNA da MTR (264, 265). Outra forma pela qual a MTR é regulada é através da existência de duas grelhas de leitura (ORF; do inglês *open reading frame*) a montante da ORF da MTR no mRNA (263). Estas duas ORF codificam para pequenos péptidos mas têm alguns codões raros na sua sequência. A existência destes codões faz com que durante o processo de tradução destas ORF os ribossomas fiquem “presos” aguardando a entrada dos tRNA (RNA de transferência) correspondentes aos codões raros. Todo este processo faz com a tradução da ORF correspondente à MTR fique impedida, levando a uma taxa de tradução mais baixa. Mutações que alterem estes codões raros levam ao aumento da taxa de tradução da ORF da MTR (263).

A enzima metionina sintetase pode existir em duas formas dentro da célula, ligada à cobalamina (vitamina B12) (holoenzima) ou sem cobalamina (apoenzima). Apenas a holoenzima é funcional pois a cobalamina é essencial em todo o processo, regulando assim a actividade da enzima. Estudos realizados demonstram que a grande maioria da MTR (cerca de 90%) se encontra na forma de holoenzima (266-268). A reacção enzimática catalisada pela MTR têm como função produzir metionina a partir da transferência de um grupo metil do 5-MTHF para a homocisteína. No entanto esta transferência não é feita de forma directa. O grupo metil é transferido primeiro para a cobalamina (cob(I)alamina), originando metilcobalamina e THF, e só depois é transferido da metilcobalamina para a homocisteína produzindo metionina e regenerando novamente a cobalamina, podendo o processo recomeçar novamente. Este ciclo é denominado de ciclo catalítico. No entanto a cada 200 a 1000 ciclos catalíticos a cob(I)alamina sofre uma oxidação formando cob(II)alamina, uma forma inactiva desta vitamina (266-269). Desta forma para que a enzima MTR possa voltar a adquirir actividade é necessário proceder à redução da cob(II)alamina. A esse processo dá-se o nome de ciclo de activação e envolve a ligação de SAM à enzima MTR e a formação de um complexo entre esta e a enzima metionina sintetase reductase (MTRR) (266, 267, 270, 271). Durante o ciclo de activação a MTR, com a colaboração da MTRR, vai transferir um grupo metil da SAM para a cob(II)alamina ao mesmo tempo que ocorre a redução desta. Assim forma-se metilcobalamina que estará pronta a reiniciar os ciclos catalíticos da enzima MTR. Assim a actividade da MTR está dependente da cobalamina, bem como da existência de SAM e MTRR para a sua reactivação cíclica (266, 267, 270, 271).

### **Polimorfismos**

O polimorfismo mais relevante do gene *MTR* é o A2756G. Este polimorfismo corresponde a uma substituição não-sinónima de uma adenina por uma guanina que resulta na alteração de um ácido aspártico por uma glicina (D919G) na proteína (225, 255, 256). Esta modificação ocorre na região de ligação da cobalamina à *MTR* (225, 255, 256). No entanto o efeito desta alteração permanece controverso. Alguns trabalhos sugerem que se trata de uma alteração activadora, levando a uma maior ligação da *MTR* à cobalamina e portanto uma maior produção de metionina e menor quantidade de homocisteína em circulação (272-276). Existem, no entanto, estudos que relacionam o alelo G a um aumento da homocisteína e diminuição da metilação, associando esta alteração a uma menor actividade da enzima *MTR* (277-280). Uma das razões para os resultados serem discrepantes deve-se ao facto de a metabolização da homocisteína não ser exclusiva da *MTR*, podendo ser realizada pela cistationina beta-sintetasse (CBS) dando origem a cistationina (281). Assim, possíveis efeitos provocados por alterações da actividade da *MTR* podem ser mascarados a nível da homocisteína pela actividade da CBS. Desta forma um maior conhecimento sobre este polimorfismo é necessário de maneira a poder melhor compreender as potenciais alterações metabólicas por ele provocadas.

Este polimorfismo apresenta variações de frequência nas diversas regiões do globo. Na Ásia e na Europa o genótipo GG apresenta uma frequência de 3%, enquanto nos Estados Unidos da América e em África apresenta uma frequência de aproximadamente 6% (225).

### **Patologias associadas**

Devido ao seu papel fundamental no ciclo do folato alterações na enzima *MTR* poderão causar problemas nas células que estarão na origem de várias patologias. As principais alterações provocadas por alterações no funcionamento da *MTR* são essencialmente os níveis de homocisteína e de metilação do DNA. Uma diminuição da actividade da enzima *MTR* provocará uma maior concentração na homocisteína e uma diminuição da concentração de metionina o que levará posteriormente a uma diminuição da metilação do DNA (255-257).

O aumento da homocisteína poderá ser prejudicial para as células devido à formação de tiolactona (282). Este composto forma-se a partir da homocisteína que se acumula quando ocorrem falhas no seu metabolismo. A tiolactona tem a capacidade de acilar proteínas provocando danos celulares graves podendo mesmo induzir a transformação oncogénica (282). Para além deste efeito, o aumento da homocisteína parece estar relacionado com instabilidade genética como a formação de micronúcleos (283).

Quanto ao efeito da diminuição da metilação do DNA o efeito é semelhante ao visto para alterações na *TYMS*: a hipometilação levará a uma desregulação da transcrição de diversos genes, o que será particularmente grave no caso da activação de oncogenes (142-145).

Para além destes efeitos mais específicos da função da MTR, a sua desregulação poderá provocar um efeito mais generalizado em todo o ciclo do folato denominado a “armadilha do metil-folato”. A “armadilha do metil-folato” consiste na incapacidade do 5-MTHF proveniente da dieta entrar no ciclo do folato devido à inactividade da MTR (Fig.1) (284). A reacção da MTR é a única forma de converter o 5-MTHF proveniente da dieta em THF de forma a distribuir o folato pelas várias reacções do ciclo do folato. Se a enzima MTR for inactivada o 5-MTHF não conseguirá ser metabolizado acabando por ser excluído da célula pois como não se encontra poli-glutamilado não conseguirá ser retido (284). Isto irá provocar não só efeitos ao nível da metilação mas também ao nível da formação de dTMP pela TYMS pois sem THF na célula não haverá formação de 5,10-MTHF necessário para a formação desse nucleótido (Fig.1) (284). Assim a desregulação do funcionamento da MTR poderá levar ao surgimento de diversas patologias. Iremos agora analisar o modo como o polimorfismo A2756G da MTR poderá estar associado ao desenvolvimento de algumas dessas patologias.

Os resultados acerca dos efeitos do polimorfismo A2756G no risco de desenvolver algum tipo de cancro têm sido muito variáveis consoante a patologia estudada e mesmo dentro de uma determinada patologia têm sido obtidos resultados divergentes. Existem alguns estudos que indicam o alelo 2756G é um factor de risco para desenvolver uma neoplasia em diversos órgãos, nomeadamente próstata, mama, bexiga, bem como outro tipo de patologias como doença coronária (285-294). No entanto foram obtidos resultados por outros autores que contrariam estes, apresentando o alelo 2756G como factor protector para o desenvolvimento de diversas patologias. Algumas dessas patologias são as mesmas para as quais foram encontrados os resultados contrários, nomeadamente o cancro da mama, a doença coronária e o linfoma (295-302). Um artigo de revisão de 2010 fez uma meta-análise dos artigos que relacionaram este polimorfismo com o desenvolvimento de doenças oncológicas e obteve um resultado interessante dado que o polimorfismo tem papéis diferentes em diferentes populações geográficas estudadas. Em populações asiáticas o alelo 2756G apresenta-se como um factor de risco para o desenvolvimento de cancro, enquanto em populações europeias apresenta-se como um factor protector (303).

São poucos os estudos que analisaram o efeito do polimorfismo MTR A2756G no CCR, sendo ainda menos aqueles que encontraram resultados estatisticamente significativos. Em termos do carcinoma do cólon, um estudo apresenta resultados não estatisticamente significativos para o efeito protector do alelo 2756G no desenvolvimento de CCR (304). Os estudos que apresentam resultados estatisticamente significativos associam o polimorfismo ao desenvolvimento de adenomas do cólon (305-307). Dois desses estudos apresentam o alelo 2756G como sendo um factor de risco, enquanto o terceiro apresenta o alelo 2756G como factor protector para o aparecimento de adenomas (305-307).

### **Inibidores**

A inibição da metionina sintetase tem um elevado interesse em termos de potencial quimioterapêutico. No entanto pouco se sabe sobre a inibição da MTR e poucos estudos têm sido realizados no sentido de procurar novos inibidores para esta enzima.

Um dos inibidores conhecidos da actividade da MTR é o etanol (308-310). Hoje é sabido que não é o álcool por si que inibe a MTR mas sim um dos produtos da sua metabolização, o acetaldeído, que forma aductos covalentes na enzima levando à sua inibição (308-310). A inibição da actividade pelo acetaldeído está relacionada com um aumento da homocisteína nas células (308-310).

Um outro inibidor conhecido da MTR é o óxido nitroso ( $N_2O$ ) e seus derivados. O  $N_2O$  é há muitos anos usado como anestésico. Alguns efeitos secundários após a anestesia, como a elevação da homocisteína, levaram ao estudo do modo de acção do  $N_2O$  que levavam a esses efeitos (311). O mecanismo de inactivação da MTR por parte do óxido nitroso está ligado à oxidação da cob(I)alamina em cob(II)alamina fazendo com que o ciclo catalítico da MTR fique interrompido (312-314). A inibição causa uma acumulação de 5-MTHF no citoplasma das células dando origem à “armadilha do metilfolato” (312, 315).

Em termos futuros a estratégia para a descoberta de novos inibidores da MTR passa por uma de três estratégias possíveis (258). Uma das estratégias passa pela criação de um antifolato que compita com o 5-MTHF pela ligação à enzima, impedindo que esta se ligue a um dos seus substratos. Outra estratégia poderá passar por criar um análogo da SAM que se ligue à MTR impedindo assim a redução da cobalamina ao seu estado activo, permanecendo a enzima no seu ciclo de activação sem conseguir prosseguir para o ciclo catalítico. A terceira estratégia passa por criar um análogo do outro substrato da enzima, a homocisteína, impedindo a sua catalização (258).

### **Factores Nutricionais**

Dada a sua posição e as suas interacções com diversos factores a MTR é um potencial alvo para a existência de interacções com factores nutricionais. Um desses factores é o consumo de álcool pois, tal como vimos anteriormente, este é um inibidor da MTR. Vários estudos se têm debruçado sobre a interacção entre o consumo de álcool e o polimorfismo A2756G no risco para desenvolver determinadas patologias (304, 305, 307, 316, 317). Os resultados não são, contudo, consensuais entre todos eles. A maioria dos estudos apresentam uma associação entre o maior consumo de álcool e o alelo 2756A como maior risco para desenvolver patologias como cancro do pâncreas, cancro colo-rectal e adenomas colo-rectais (304, 307, 316, 317). Outro estudo no entanto relaciona o elevado consumo de álcool com o alelo 2756G como factor de risco para o desenvolvimento de adenoma colo-rectal (305).

Outro factor nutricional importante é o consumo de vitamina B12 (cobalamina) devido a esta ser um cofactor essencial para o funcionamento da MTR. Existe um estudo que associa a interacção entre o alelo 2756G do polimorfismo da MTR e o baixo consumo de vitamina B12 com um maior risco de desenvolver CCR (318).

Por último um dos principais nutrientes que poderá estar relacionado o funcionamento da MTR é o folato. Como já vimos anteriormente a actividade da MTR é responsável por incorporar o folato proveniente da dieta no ciclo do folato através do 5-MTHF (Fig.1). Assim os níveis de consumo de folato poderão modelar a actividade da enzima. Existe um estudo que associa a interacção entre o alelo 2756G e o baixo consumo de folato com um risco superior de desenvolver cancro da bexiga (319).

Devido a todas as possibilidades de interacções entre o polimorfismo A2756G e o consumo de determinados nutrientes obtidos na dieta e dado o baixo número de estudos efectuados até ao momento, nomeadamente em CCR, torna-se essencial aumentar o número de estudos de modo a investigar possíveis interacções entre MTR e a dieta.

### **3. DOENÇA DE CROHN**

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória do tracto gastrointestinal que afecta milhões de pessoas mundialmente (320). Durante muito tempo foi considerada uma doença de países desenvolvidos afectando essencialmente o Norte da Europa e a América do Norte, apresentando uma baixa incidência na Ásia e em África (321-323). No entanto nos últimos anos esta diferença tem-se vindo a esbater essencialmente devido a uma adopção de um modo de vida mais “ocidentalizado” nos países em vias de desenvolvimento (320, 324).

Na Europa está descrita uma prevalência que varia entre 10 e 150 casos por cada 100.000 habitantes, com uma distribuição semelhante entre homens e mulheres (325, 326). Estudos nos EUA apontam para uma prevalência cerca de 174 casos por cada 100.000 habitantes, verificando-se a mesma tendência que na Europa para a distribuição por género (327). Em Portugal um estudo publicado em 2007 estimou uma prevalência da DC de 60 casos por cada 100.000 habitantes (328). A mortalidade em pacientes com DC é apenas ligeiramente superior ao resto da população de acordo com duas meta-análises de 2007 e 2010 (329, 330). A idade média de diagnóstico para a DC encontra-se nos 30 anos de acordo com vários estudos realizados em vários locais do mundo (331, 332).

O conjunto de acontecimentos na origem da DC permanece ainda hoje por elucidar de forma clara. É no entanto aceite por todos a base multifactorial desta patologia para a qual contribuem factores genéticos e ambientais.

### **Caracterização Clínica e Terapêutica**

A DC caracteriza-se por ser uma doença inflamatória transmural que pode envolver várias regiões do tracto gastrointestinal desde a boca até ao ânus, sendo que entre 40% dos casos envolvem a regiões do cólon e íleo (333). A localização das regiões afectadas tende a ser estável ao longo do tempo, sendo que apenas 10% dos pacientes apresenta uma alteração da localização (334, 335). As lesões mais comuns que afectam estes doentes são as estrituras intestinais, fistúlas ou abscessos, podendo a progressão das lesões ocorrer no espaço de semanas ou de décadas (333). Esta progressão pode ser retardada, parada ou até mesmo revertida com recurso a terapia adequada (336, 337). As lesões com maior probabilidade de serem curadas são as lesões superficiais da mucosa, ao passo que as úlceras são mais difíceis de curar e as estrituras fibróticas são normalmente definitivas (336, 337). As lesões iniciais serão essencialmente inflamatórias e não-penetrantes, evoluindo com o passar do tempo para abscessos, úlceras e estrituras. A evolução da doença está intimamente ligada à sua localização no tracto gastrointestinal, uma vez que as lesões no intestino delgado tendem a progredir de forma mais frequente e mais rápida, ao passo que as lesões na região do cólon tendem a permanecer inflamatórias e não-penetrantes por mais tempo (334, 335). Os casos de DC podem ser classificados de acordo com os critérios da classificação de Montreal que compreendem a idade de diagnóstico, localização das lesões e comportamento da doença (338). Quanto à idade de diagnóstico esta classificação distingue três grupos: abaixo dos 16 anos (A1), entre os 16 e 40 anos (A2) e acima dos 40 anos (A3). No que se refere à localização os casos podem ser classificados consoante as lesões se encontram no íleo (L1), cólon (L2), colo-ílicas (L3), ou na parte superior do trato gastrointestinal (L4). Por último no que concerne ao comportamento da doença esta pode ser classificada como não-penetrante e não-estriturante (B1), estriturante (B2), penetrante (B3) e perianal (p), sendo que esta última categoria é utilizada em combinação com as outras categorias (B1, B2 e B3) (338).

Os principais sintomas apresentados por doentes com DC são a dor abdominal, desregulação da função intestinal e a hemorragia rectal (336, 337), podendo apresentar outros sintomas como náusea, febre, vômito entre outros (339). As lesões localizadas na região colo-rectal tendem a apresentar sintomatologia mais cedo que as lesões situadas no intestino delgado que podem ficar latentes por vários anos (336, 337). A maioria dos pacientes apresentará os sintomas de forma intermitente alternando episódios agudos com alturas de remissão com duração variável, enquanto 20% dos pacientes desenvolverão uma doença crónica (336, 337). A sintomatologia não está directamente relacionada com o decurso da doença pois lesões como as úlceras e estrituras podem permanecer assintomáticas por vários anos (337). Para além das manifestações no tracto gastrointestinal a DC pode apresentar manifestações extra-intestinais nomeadamente complicações oculares, músculo-esqueléticas, vasculares e renais (340). Estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado um aumento da homocisteína associado aos pacientes com DC (341-344). A hiperhomocisteinemia poderá ter origem em deficiências em vitaminas B6 e B12 (343, 345) e estar na origem de algumas manifestações extra-intestinais



como a osteoporose (346), problemas vasculares (345, 347) bem como estar associada ao desenvolvimento de cancro colo-rectal (348).

Durante muitos anos o objectivo da terapêutica na DC consistia em apenas no alívio dos sintomas. No entanto os objectivos da terapêutica actual passam pela remissão clínica da doença (349, 350). A estratégia terapêutica na DC pode passar por diferentes grupos de fármacos ou em casos mais extremos pela cirurgia.

Um dos tipos de fármacos mais utilizado são os corticosteróides. Os corticosteróides são dos fármacos mais eficazes na indução de remissão na DC, apresentando no entanto alguns efeitos adversos não sendo utilizados como terapêutica permanente (351). Entre os corticosteróides mais utilizados encontram-se a prednisolona e a budesonida (352).

Os 5-Aminosalicilatos (5-ASA) são dos fármacos mais utilizados como monoterapia inicial podendo ser utilizados em combinação com os corticosteróides em casos mais severos. Este grupo de fármacos permite uma utilização mais prolongada devido à sua menor toxicidade. Entre os 5-asa mais utilizados encontram-se a sulfasalazina e a mesalazina (352).

Outro fármaco muito importante no tratamento da DC é a Azatioprina (AZA). Esta droga é altamente eficaz em casos moderados ou severos de DC, sendo recomendada em casos onde exista dependência de esteróides (353, 354).

Nos casos em que estas terapias não apresentem resultados pode-se recorrer a uma terapia de imunossupressão de segunda linha. Estes tratamentos podem incluir agentes terapêuticos como o metotrexato, ciclosporina ou o anti-corpo monoclonal anti-TNF (infliximab) (355, 356).

Nos casos em que a terapia medicamentosa falha há que recorrer à cirurgia. Aproximadamente 75% dos doentes com DC terão que recorrer a cirurgia em algum ponto do decurso da sua patologia, sendo o objectivo das terapias mais recentes evitar ao máximo o ter que recorrer a este processo (357).

### **Factores Genéticos**

Desde cedo que diversas evidências epidemiológicas revelaram a existência de um papel importante de factores genéticos no desenvolvimento da DC (358). Vários estudos em gémeos monozigóticos evidenciavam uma maior frequência de DC quando comparados com gémeos dizigóticos (358). Isto levou a que vários estudos tenham sido feitos desde então na tentativa de identificar os genes envolvidos no desenvolvimento de DC. No entanto esta busca não tem sido tarefa fácil devido a diversos factores como o envolvimento de diversos genes, a hereditariedade não-mendeliana de alguns destes genes e a influência de factores ambientais (358). Até ao momento foram identificados mais de 30 *loci* que parecem estar envolvidos quer no surgimento, quer no prognóstico da DC, abrangendo diversas funções celulares tais como: receptores de reconhecimento celular, homeostase epitelial, autofagia, diferenciação linfocitária, resposta imunológica e apoptose (359). Nestes *loci* existem três genes para os quais as associações encontradas têm mostrado maiores evidências de estarem associados a um aumento da

susceptibilidade: *NOD2* (*nucleotide-binding oligomerization domain-2*), *IL23R* (*interleukin 23 receptor*) e *ATG16L1* (*Autophagy-related protein 16-1*) (358).

Nos genes de receptores celulares associados a maior susceptibilidade para desenvolver DC o destaque vai para o gene *NOD2*. Este gene é expresso em diversos tipo de células nomeadamente monócitos, macrófagos, células dendríticas e células de Paneth, sendo a sua função o reconhecimento do dipéptido muramil com origem no peptidoglicano bacteriano ajudando assim a desencadear a resposta imunitária.(360, 361). Cerca de 30 polimorfismos deste gene têm sido associados à susceptibilidade para desenvolver DC mas os três mais comuns são R702W, G908R e 1007Fs (362-364). Embora os efeitos destes polimorfismos não estejam claramente definidos parecem resultar numa resposta imunitária deficiente na presença de bactérias. Estes polimorfismos encontram-se com maior frequência em populações Europeias de pacientes com DC (35-45%) do que em populações com origem no continente africano ou asiático (364-367).

A produção desregulada de citocinas tem sido associada à génese de DC, nomeadamente devido a um aumento de células T CD4<sup>+</sup> (368). Neste aumento está envolvido o gene *IL23R*, relacionado com o aumento de células Th17 (*T helper 17*). Este gene, que é altamente expresso em células T memória do sistema imunitário, está envolvido em processos pró-inflamatórios. Quando activado pela IL23 (interleucina 23) este gene irá levar a um aumento dos níveis da IL17 (interleucina 17) produzida pelos linfócitos Th17, desencadeando processos pró-inflamatórios que se encontram em pacientes com DC (369). Vários estudos têm associado alterações neste gene com a susceptibilidade para o desenvolvimento de DC (369-371).

O gene *ATG16L1* está envolvido em processos de autofagia. A autofagia é um processo celular altamente regulado que consiste na degradação de estruturas intracelulares danificadas e de invasores patogénicos intracelulares (372). Este processo representa uma forma de defesa contra microorganismos intracelulares e cuja desregulação poderá estar no aparecimento de uma resposta imunológica inata anormal. Esta resposta imunológica anómala poderá estar envolvida no aparecimento de DC, não estando no entanto o mecanismo pelo qual tal poderá acontecer totalmente elucidado. Vários estudos têm no entanto mostrado uma forte correlação entre o gene *ATG16L1* e o aumento da susceptibilidade para o aparecimento de DC (373, 374).

Em relação aos genes associados ao metabolismo do folato o gene *MTHFR* (metileno tetrahydrofolato reductase) tem sido estudado acerca da influência do seu polimorfismo C677T na susceptibilidade para a DC. Nenhuma associação foi encontrada entre este polimorfismo e o risco de DC (375-377). Em relação ao gene *MTR* (metionina sintetase) apenas um estudo foi realizado em DC, não tendo sido encontrada qualquer associação, tendo sido no entanto encontrada associação com colite ulcerosa (290).

Para além de associações de genes a susceptibilidade de DC também foram encontradas várias associações entre diversos genes e o prognóstico em pacientes com DC. Novamente o gene *NOD2* demonstra diversos tipos de associações, evidenciando o seu importante papel nesta patologia.

Vários genes têm sido associados ao aparecimento precoce da DC. Entre eles encontram-se os genes mencionados anteriormente: *NOD2*, *IL23R* e *ATG16L1* (378, 379). Existem também, no entanto, alguns estudos que contrariam qualquer tipo de associação entre os genes e a idade de diagnóstico (380).

Relativamente à manifestação da doença existem diversos tipos de associações conhecidas. Alterações no gene *NOD2* têm sido associadas à formação de estrituras e estenose levando a uma obstrução intestinal aguda (381, 382). No que se refere ao fenótipo inflamatório da doença este está associado a um aumento das citocinas pró-inflamatórias, tais como IL6 (interleucina 6), IL8 (interleucina 8) e TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) e a uma diminuição das citocinas anti-inflamatórias tais como a IL10 (interleucina 10) (383-386). Deste modo vários autores estudaram possíveis associações de polimorfismos nos genes destas várias citocinas com o fenótipo inflamatório da DC. Foram encontradas associações principalmente entre polimorfismos nos genes da IL6 e do TNF $\alpha$  com actividade inflamatória em pacientes com DC (387-390).

Existem também polimorfismos em diversos genes que têm sido associados a diferentes localizações das lesões em pacientes com DC. Uma vez mais o *NOD2* surge como um desses factores, associado a lesões na parte superior do tracto gastrointestinal (391). Alterações no gene da IL10 aparecem associadas a lesões na região do íleo (392) enquanto alterações no gene *ATG16L1* aparecem associadas as lesões ileocolónicas (393).

Uma área particularmente interessante para o estudo de influência do genótipo é a terapêutica. Vários estudos têm sido realizados na área da farmacogenética na tentativa de melhor adequar o tratamento sugerido a um paciente de acordo com o seu genótipo. Um dos exemplos onde se obtiveram resultados é o caso do gene *TPMT* (*thiopurine S-methyltransferase*) e o fármaco azatioprina. Vários estudos revelaram uma associação entre polimorfismos no gene *TPMT* e efeitos secundários da terapia com azatioprina, nomeadamente a toxicidade ao nível da medula óssea (394, 395). Outro caso encontrado é a associação do polimorfismo G2677T do gene *MDR1* (*multidrug resistance protein 1*) com a intolerância a tratamentos com azatioprina e metotrexato (396, 397).

### **Factores Ambientais**

Sendo a DC uma patologia com origem multifactorial para além dos factores genéticos existem factores ambientais que se encontram relacionados não só com a susceptibilidade como com o decurso da DC. De entre os diversos factores estudados podemos salientar dois: os hábitos tabágicos e a dieta (398).

Os hábitos tabágicos são um dos factores ambientais mais estudados na DC (399). O tabaco tem sido estudado quer como factor de susceptibilidade quer como factor preponderante no decurso da doença. Dos vários estudos realizados ao longo dos anos tem-se verificado um aumento de risco de desenvolver DC entre os indivíduos fumadores quando comparados com os não fumadores (399-401). Os mecanismos associados a este aumento da susceptibilidade ainda

não estão completamente esclarecidos embora existam algumas hipóteses em aberto. Uma está relacionada com o facto de o tabaco diminuir a imunidade celular e humoral (402, 403). Outra hipótese relaciona os hábitos tabágicos com uma diminuição da motilidade intestinal (404). Existem ainda a possibilidade de o efeito do consumo de tabaco na susceptibilidade de desenvolver DC esteja associado a alterações na vasodilatação intestinal que pode resultar em isquémia e fibrose (405, 406).

Para além da importância como factor promotor da DC, o tabaco apresenta-se como um factor importante no decurso da doença, levando a um pior prognóstico (407). O tabaco tem sido associado a uma maior probabilidade de recidivas (408) e a uma maior dependência de imunomoduladores (409). Os hábitos tabágicos têm ainda sido associados a uma progressão da doença mais rápida (410, 411).

A dieta é também um factor com possibilidade de influenciar o desenvolvimento e decurso da DC, através da alteração da microflora entérica ou através da alteração da expressão e interacção genética (412). De entre os vários nutrientes estudados os açúcares, as gorduras e a fibra são os que mais se têm destacado como influenciadores da DC (412).

O elevado consumo de açúcares tem sido associado por vários ao longo dos anos como um factor de risco de desenvolvimento de DC (413-415). O mecanismo pelo qual o consumo de açúcar poderá estar associado ao desenvolvimento de DC estará relacionado com o desenvolvimento de resistência à insulina, criando assim uma inflamação crónica (416). No entanto os resultados não são consensuais havendo alguns autores que defendem não haver ligação, mostrando assim haver alguma inconsistência nos resultados (417).

Em relação ao efeito do consumo de fibra no desenvolvimento de DC os resultados têm sido ainda mais inconsistentes. Existem estudos que mostram uma correlação negativa entre o consumo de fibra e a susceptibilidade para desenvolver DC (418, 419). Esta diminuição da susceptibilidade poderá estar relacionada com a produção de butirato durante a fermentação das fibras. O butirato tem um papel anti-inflamatório pois previne a produção de citocinas pró-inflamatórias (420). Existem contudo estudos que apresentam resultados onde a fibra não parece influenciar a susceptibilidade para o desenvolvimento de DC (421). Esta inconsistência nos resultados não permite mais do que especular de uma forma teórica sobre o papel do consumo de fibra na DC.

Um dos nutrientes ao qual tem sido dado mais destaque nos anos recentes é a gordura, dado o seu papel no estado inflamatório (422). Os ácidos gordos polinsaturados (AGPI) n-6 e n-3 são obtidos exclusivamente pela dieta e são extremamente importantes no estado inflamatório (423). Dos AGPI n-6 o ácido linoleico é o que mais se destaca por ser o precursor metabólico do ácido araquidónico. O ácido araquidónico é conhecido por estar associado a processos inflamatórios (424). No sentido inverso nos AGPI n-3 o ácido  $\alpha$ -linoleico está na origem do ácido eicosapentaenóico (AEP) e do ácido docosahexanóico (ADH), responsáveis por um efeito antagonista na produção de eicosanóides pró-inflamatórios por parte do ácido araquidónico (425). O AEP e o ADH suprimem ainda a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e inibem a expressão de alguns genes associados ao processo inflamatório (423, 426).

Diversos estudos epidemiológicos realizados demonstraram haver uma correlação entre o maior consumo de gorduras, nomeadamente de AGPI n-6 e com um menor consumo de AGPI n-3, e a susceptibilidade para desenvolver DC (415, 427, 428). O *ratio* do consumo de n-6:n-3 quando elevado tem sido associado por alguns autores aumento do risco de desenvolver DC (429, 430). Nas sociedades industrializadas verifica-se um *ratio* de 20:1 quando o aconselhado seria um *ratio* de cerca 2:1 (430).

#### **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Garcia M JA, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global Cancer Facts & Figures 2007. American Cancer Society. 2007.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
3. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
4. Ruddon RW. *Cancer biology*. 4th ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2007.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
6. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(3):177-83.
7. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature genetics*. 2008;40(6):695-701.
8. Dong LM, Potter JD, White E, Ulrich CM, Cardon LR, Peters U. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2008;299(20):2423-36.
9. Hanash S. Integrated global profiling of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(8):638-44.
10. Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nature reviews Genetics*. 2000;1(1):48-56.
11. Fearnhead NS, Wilding JL, Winney B, Tonks S, Bartlett S, Bicknell DC, et al. Multiple rare variants in different genes account for multifactorial inherited susceptibility to colorectal adenomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(45):15992-7.
12. Iyengar SK, Elston RC. The genetic basis of complex traits: rare variants or "common gene, common disease"? *Methods Mol Biol*. 2007;376:71-84.
13. Kryukov GV, Pennacchio LA, Sunyaev SR. Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *American journal of human genetics*. 2007;80(4):727-39.
14. Milne RL, Benitez J. Current strategies in the search for low penetrance genes in cancer. *Histology and histopathology*. 2008;23(4):507-14.
15. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(9):665-76.
16. Rigakos G, Razis E. BRCAness: Finding the Achilles Heel in Ovarian Cancer. *The Oncologist*. 2012;17(7):956-62.

17. Plotz G, Zeuzem S, Raedle J. DNA mismatch repair and Lynch syndrome. *Journal of molecular histology*. 2006;37(5-7):271-83.
18. Senter L. Genetic Testing by Cancer Site: Colon (Nonpolyposis Syndromes). *The Cancer Journal*. 2012;18(4):334-7 10.1097/PPO.0b013e31826094b2.
19. Bishop JN, Harland M, Randerson-Moor J, Bishop DT. Management of familial melanoma. *The lancet oncology*. 2007;8(1):46-54.
20. Ward KA, Lazovich D, Hordinsky MK. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: A review of the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;67(5):1055-67.
21. Claes K, Dahan K, Tejpar S, De Paepe A, Bonduelle M, Abramowicz M, et al. The genetics of familial adenomatous polyposis (FAP) and MutYH-associated polyposis (MAP). *Acta gastro-enterologica Belgica*. 2011;74(3):421-6.
22. Chun N, Ford JM. Genetic testing by cancer site: stomach. *Cancer J*. 2012;18(4):355-63.
23. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2009;59(6):366-78.
24. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(6):1688-94.
25. (IARC) IAfRoC. GLOBOCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2008 [Internet]. 2008.
26. Leitão C. Prevenção do cancro do cólon e recto. *Jornal Português de Gastroenterologia*. 2002;9:105-14.
27. Mendes V. Prevenir o cancro do colon e recto. *Jornal Português de Gastroenterologia*. 2008;15(4):153-5.
28. Fletcher RH. The diagnosis of colorectal cancer in patients with symptoms: finding a needle in a haystack. *BMC medicine*. 2009;7:18.
29. Terhaar sive Droste JS, Oort FA, van der Hulst RW, Coupe VM, Craanen ME, Meijer GA, et al. Does delay in diagnosing colorectal cancer in symptomatic patients affect tumor stage and survival? A population-based observational study. *BMC cancer*. 2010;10:332.
30. Topping ML, Frydenberg M, Hansen RP, Olesen F, Hamilton W, Vedsted P. Time to diagnosis and mortality in colorectal cancer: a cohort study in primary care. *British journal of cancer*. 2011;104(6):934-40.
31. Ramos M, Esteva M, Cabeza E, Campillo C, Llobera J, Aguiló A. Relationship of diagnostic and therapeutic delay with survival in colorectal cancer: A review. *European Journal of Cancer*. 2007;43(17):2467-78.

32. Schoen RE. The case for population-based screening for colorectal cancer. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(1):65-70.
33. Heiken J. Screening for colon cancer. *Cancer Imaging*. 2006;6:S13–S21.
34. Dionigi G, Bianchi V, Rovera F, Boni L, Annoni M, Castano P, et al. Genetic alteration in hereditary colorectal cancer. *Surgical oncology*. 2007;16 Suppl 1:S11-5.
35. Trimboth JD, Giardiello FM. Genetic testing and counselling for hereditary colorectal cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2002;16(11):1843-57.
36. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterology clinics of North America*. 2008;37(1):1-24, v.
37. Tsai CJ, Lu DK. Small colorectal polyps: histopathology and clinical significance. *The American journal of gastroenterology*. 1995;90(6):988-94.
38. BC Morson ID. *Gastrointestinal pathology*: Oxford: Blackwell Scientific; 1972.
39. Bussey HJR. *Familial polyposis coli : family studies, histopathology, differential diagnosis, and results of treatment*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1975.
40. Heald RJ, Bussey HJ. Clinical experiences at St. Mark's Hospital with multiple synchronous cancers of the colon and rectum. *Diseases of the colon and rectum*. 1975;18(1):6-10.
41. Morson BC. *The pathogenesis of colorectal cancer*. Philadelphia: Saunders; 1978.
42. Stryker SJ, Wolff BG, Culp CE, Libbe SD, Ilstrup DM, MacCarty RL. Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*. 1987;93(5):1009-13.
43. Blue MG, Sivak MV, Jr., Achkar E, Matzen R, Stahl RR. Hyperplastic polyps seen at sigmoidoscopy are markers for additional adenomas seen at colonoscopy. *Gastroenterology*. 1991;100(2):564-6.
44. Cappell MS, Forde KA. Spatial clustering of multiple hyperplastic, adenomatous, and malignant colonic polyps in individual patients. *Diseases of the colon and rectum*. 1989;32(8):641-52.
45. Deans GT, Patterson CC, Parks TG, Spence RA, Heatley M, Moorehead RJ, et al. Colorectal carcinoma: importance of clinical and pathological factors in survival. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 1994;76(1):59-64.
46. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd C-J, et al. Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene Expression. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2003;12(8):755-62.
47. McCallion K, Mitchell RM, Wilson RH, Kee F, Watson RG, Collins JS, et al. Flexible sigmoidoscopy and the changing distribution of colorectal cancer: implications for screening. *Gut*. 2001;48(4):522-5.



48. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Digestive and Liver Disease*. 2001;33(4):372-88.
49. Chua YJ, Zalcborg JR. Progress and challenges in the adjuvant treatment of stage II and III colon cancers. *Expert review of anticancer therapy*. 2008;8(4):595-604.
50. Aschele C, Bergamo F, Lonardi S. Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2009;35(6):509-16.
51. Sugimoto S, Katano K, Kanazawa A, Yoshimura H, Kidani A, Takeda H, et al. Multicenter safety study of mFOLFOX6 for unresectable advanced/recurrent colorectal cancer in elderly patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2009;28(1):109.
52. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(16):2938-47.
53. Comella P, Casaretti R, De Vita F, Avallone A, Orditura M, Petrillo A, et al. Concurrent irinotecan and 5-fluorouracil plus levo-folinic acid given every other week in the first-line management of advanced colorectal carcinoma: A phase I study of the Southern Italy Cooperative Oncology Group. *Annals of Oncology*. 1999;10(8):915-21.
54. Segal NH, Saltz LB. Evolving Treatment of Advanced Colon Cancer. *Annual Review of Medicine*. 2009;60(1):207-19.
55. Dienstmann R, Markman B, Tabernero J. Application of monoclonal antibodies as cancer therapy in solid tumors. *Current clinical pharmacology*. 2012;7(2):137-45.
56. Calvert PM, Frucht H. The Genetics of Colorectal Cancer. *Annals of Internal Medicine*. 2002;137(7):603-12.
57. Mecklin J-P. The implications of genetics in colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2008;19(suppl 5):v87-v90.
58. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(47):18654-9.
59. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *Journal of gastroenterology*. 2006;41(3):185-92.
60. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
61. Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA. Dynamics of colorectal cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(6):484-93.
62. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science*. 2007;120(19):3327-35.

63. Nāthke IS. THE ADENOMATOUS POLYPOSIS COLI PROTEIN: The Achilles Heel of the Gut Epithelium. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2004;20(1):337-66.
64. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of Screening for Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(35):5783-8.
65. Lynch H, Lynch J, Lynch P, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Familial cancer*. 2008;7(1):27-39.
66. Aryal KR, Perakath B, Morton DG. Hereditary colorectal cancer: screen the parents (!). *Colorectal Disease*. 2008;10(8):773-4.
67. Castells A, Castellví-Bel S, Balaguer F. Concepts in Familial Colorectal Cancer: Where Do We Stand and What Is the Future? *Gastroenterology*. 2009;137(2):404-9.
68. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & development*. 2007;21(20):2525-38.
69. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(10):769-80.
70. Chan AT, Giovannucci EL. Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2029-43.e10.
71. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer*. 2009;125(1):171-80.
72. Chao A, Connell CJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel AV, Calle EE, et al. Amount, Type, and Timing of Recreational Physical Activity in Relation to Colon and Rectal Cancer in Older Adults: the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2004;13(12):2187-95.
73. Friedenreich C, Norat T, Steindorf K, Boutron-Ruault M-C, Pischon T, Mazuir M, et al. Physical Activity and Risk of Colon and Rectal Cancers: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006;15(12):2398-407.
74. Larsson SC, Rutegård J, Bergkvist L, Wolk A. Physical activity, obesity, and risk of colon and rectal cancer in a cohort of Swedish men. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2006;42(15):2590-7.
75. Kruk J, Aboul-Enein HY. Physical Activity in the Prevention of Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006;7(1):11-21.
76. Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms. *The Journal of Nutrition*. 2002;132(11):3456S-64S.

77. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of 31 Studies with 70,000 Events. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2007;16(12):2533-47.
78. Dai Z, Xu Y, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol*. 2007;13(31):4199-206.
79. Giovannucci E. Insulin, Insulin-Like Growth Factors and Colon Cancer: A Review of the Evidence. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(11):3109S-20S.
80. Gunter MJ, Leitzmann MF. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2006;17(3):145-56.
81. Popkin BM. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(2):289-98.
82. Doyle VC. Nutrition and Colorectal Cancer Risk: A Literature Review. *Gastroenterology Nursing*. 2007;30(3):178-82 10.1097/01.SGA.0000278165.05435.c0.
83. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 2011;343.
84. Bingham S. The fibre–folate debate in colo-rectal cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2006;65(01):19-23.
85. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet*. 2003;361(9368):1496-501.
86. Schatzkin A, Mouw T, Park Y, Subar AF, Kipnis V, Hollenbeck A, et al. Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(5):1353-60.
87. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, Vegetables, Dietary Fiber, and Risk of Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(7):525-33.
88. Hague A, Paraskeva C. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur J Cancer Prev*. 1995;4(5):359-64.
89. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, et al. Dairy Foods, Calcium, and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 10 Cohort Studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(13):1015-22.
90. Ishihara J, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S. Dietary calcium, vitamin D, and the risk of colorectal cancer. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(6):1576-83.

91. Kampman E, Giovannucci E, van't Veer P, Rimm E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Calcium, Vitamin D, Dairy Foods, and the Occurrence of Colorectal Adenomas among Men and Women in Two Prospective Studies. *American journal of epidemiology*. 1994;139(1):16-29.
92. Tseng M, Murray SC, Kupper LL, Sandier RS. Micronutrients and the Risk of Colorectal Adenomas. *American journal of epidemiology*. 1996;144(11):1005-14.
93. Pufulete M. Intake of dairy products and risk of colorectal neoplasia. *Nutrition Research Reviews*. 2008;21(01):56-67.
94. Giovannucci E. Epidemiologic Studies of Folate and Colorectal Neoplasia: a Review. *The Journal of Nutrition*. 2002;132(8):2350S-5S.
95. Kennedy DA, Stern SJ, Moretti M, Matok I, Sarkar M, Nickel C, et al. Folate intake and the risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology*. 2011;35(1):2-10.
96. Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: A meta-analytical approach. *International Journal of Cancer*. 2005;113(5):825-8.
97. Choi S-W, Mason JB. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme1–3. *The Journal of Nutrition*. 2000;130(2):129-32.
98. Kim Y-I. Nutritional Epigenetics: Impact of Folate Deficiency on DNA Methylation and Colon Cancer Susceptibility. *The Journal of Nutrition*. 2005;135(11):2703-9.
99. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2012;3(1):21-38.
100. Duthie S. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *Journal of inherited metabolic disease*. 2011;34(1):101-9.
101. Liu J, Ward RL. 4 - Folate and One-Carbon Metabolism and Its Impact on Aberrant DNA Methylation in Cancer. In: Zdenko H, Toshikazu U, editors. *Advances in genetics*: Academic Press; 2010. p. 79-121.
102. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Intake of Fat, Meat, and Fiber in Relation to Risk of Colon Cancer in Men. *Cancer research*. 1994;54(9):2390-7.
103. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of Meat, Fat, and Fiber Intake to the Risk of Colon Cancer in a Prospective Study among Women. *New England Journal of Medicine*. 1990;323(24):1664-72.
104. Cheng K, Raufman J-P. Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochemical pharmacology*. 2005;70(7):1035-47.

105. Debruyne PR, Bruyneel EA, Li X, Zimber A, Gespach C, Mareel MM. The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;480–481(0):359-69.
106. Mason JB, Choi S-W. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. *Alcohol (Fayetteville, NY)*. 2005;35(3):235-41.
107. Cravo MIL, Camilo ME. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins b6 and b12 status. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2000;16(4):296-302.
108. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *The lancet oncology*. 2006;7(2):149-56.
109. Coussens L, Zitvogel L, Palucka A. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*. 2013;339(6117):286-91.
110. Perwez Hussain S, Harris CC. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer*. 2007;121(11):2373-80.
111. Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Grazia Totaro M, Allavena P, Mantovani A, et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009;214(9–10):761-77.
112. Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Risk Factors, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies. *Anticancer research*. 2009;29(7):2727-37.
113. Goh J, O'Morain CA. Nutrition and adult inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2003;17(3):307-20.
114. Burger D, Travis S. Conventional Medical Management of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1827-37.e2.
115. Alastair F, Emma G, Emma P. Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2011;35(5):571-80.
116. Dyson J, Rutter M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol*. 2012;18(29):3839-48.
117. Dietrich M, Brown CJP, Block G. The Effect of Folate Fortification of Cereal-Grain Products on Blood Folate Status, Dietary Folate Intake, and Dietary Folate Sources among Adult Non-Supplement Users in the United States. *Journal of the American College of Nutrition*. 2005;24(4):266-74.
118. O'Brein JD, Temperley IJ, Brown JP, Scott JM. Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid. *The American journal of clinical nutrition*. 1975;28(5):438-44.

119. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009;462(7271):315-22.
120. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*. 1987;196(2):261-82.
121. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(6):3740-5.
122. Prokhortchouk E, Defossez P-A. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2008;1783(11):2167-73.
123. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(7):3290-5.
124. Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;475(1-2):57-67.
125. Ames BN. Micronutrient Deficiencies: A Major Cause of DNA Damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;889(1):87-106.
126. Finnell RH, Greer KA, Barber RC, Piedrahita JA, Shaw GM, Lammer EJ. Neural Tube and Craniofacial Defects With Special Emphasis On Folate Pathway Genes. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1998;9(1):38-53.
127. Bailey RL, Mills JL, Yetley EA, Gahche JJ, Pfeiffer CM, Dwyer JT, et al. Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged ≥60 y in the United States. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;92(2):383-9.
128. Stead LM, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. Methylation demand and homocysteine metabolism. *Advances in Enzyme Regulation*. 2004;44(1):321-33.
129. Stover PJ. One-Carbon Metabolism—Genome Interactions in Folate-Associated Pathologies. *The Journal of Nutrition*. 2009;139(12):2402-5.
130. Winter-Vann AM, Kamen BA, Bergo MO, Young SG, Melnyk S, James SJ, et al. Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: An unexpected property of methotrexate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(11):6529-34.
131. Stover P. Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4(5):293-305.
132. Appling DR. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *The FASEB Journal*. 1991;5(12):2645-51.

133. Fox JT, Stover PJ. Chapter 1 Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. In: Gerald L, editor. Vitamins & Hormones: Academic Press; 2008. p. 1-44.
134. Davis SR, Stacpoole PW, Williamson J, Kick LS, Quinlivan EP, Coats BS, et al. Tracer-derived total and folate-dependent homocysteine remethylation and synthesis rates in humans indicate that serine is the main one-carbon donor. American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism. 2004;286(2):E272-E9.
135. Herbig K, Chiang E-P, Lee L-R, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic Serine Hydroxymethyltransferase Mediates Competition between Folate-dependent Deoxyribonucleotide and S-Adenosylmethionine Biosyntheses. Journal of Biological Chemistry. 2002;277(41):38381-9.
136. Anderson DD, Stover PJ. SHMT1 and SHMT2 Are Functionally Redundant in Nuclear *De novo* Thymidylate Biosynthesis. PloS one. 2009;4(6):e5839.
137. Woeller CF, Anderson DD, Szebenyi DME, Stover PJ. Evidence for Small Ubiquitin-like Modifier-dependent Nuclear Import of the Thymidylate Biosynthesis Pathway. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(24):17623-31.
138. Genetics Co. Folic Acid for the Prevention of Neural Tube Defects. Pediatrics. 1999;104(2):325-7.
139. Holmquist C, Larsson S, Wolk A, de Faire U. Multivitamin Supplements Are Inversely Associated with Risk of Myocardial Infarction in Men and Women—Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). The Journal of Nutrition. 2003;133(8):2650-4.
140. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. Nature reviews Cancer. 2003;3(8):601-14.
141. Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P, Fenech M. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism, Folic Acid and Riboflavin Are Important Determinants of Genome Stability in Cultured Human Lymphocytes. The Journal of Nutrition. 2004;134(1):48-56.
142. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, et al. Moderate Folate Depletion Increases Plasma Homocysteine and Decreases Lymphocyte DNA Methylation in Postmenopausal Women. The Journal of Nutrition. 1998;128(7):1204-12.
143. Rampsaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. The American journal of clinical nutrition. 2000;72(4):998-1003.
144. Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. Cancer letters. 2002;185(1):1-12.
145. Teodoridis JM, Strathee G, Brown R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2004;7(4):267-78.

146. Issa J-PJ. DNA Methylation as a Therapeutic Target in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(6):1634-7.
147. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
148. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of inherited metabolic disease*. 2011;34(1):75-81.
149. Climie S, Santi DV. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(2):633-7.
150. Daron HH, Aull JL. A kinetic study of thymidylate synthase from *Lactobacillus casei*. *Journal of Biological Chemistry*. 1978;253(3):940-5.
151. Hori T, Takahashi E, Ayusawa D, Takeishi K, Kaneda S, Seno T. Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Human genetics*. 1990;85(6):576-80.
152. Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Gotoh O, Seno T, et al. Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(33):20277-84.
153. Horie N, Takeishi K. Identification of Functional Elements in the Promoter Region of the Human Gene for Thymidylate Synthase and Nuclear Factors That Regulate the Expression of the Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(29):18375-81.
154. Lee Y, Shen G, Johnson LF. Complex Transcriptional Initiation Pattern of the Thymidylate Synthase Promoter in Mouse Tissues. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999;372(2):389-92.
155. Chu E, Voeller D, Koeller DM, Drake JC, Takimoto CH, Maley GF, et al. Identification of an RNA binding site for human thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(2):517-21.
156. Hisatomi H, Tanemura H, Iizuka T, Katsumata K, Nagao K, Sumida H, et al. Differential alternative splicing expressions of thymidylate synthase isoforms. *Cancer letters*. 2003;193(2):127-31.
157. Takeishi K, Kaneda S, Ayusawa D, Shimizu K, Gotoh O, Seno T. Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. *Nucleic acids research*. 1985;13(6):2035-43.
158. Prasanna V, Gopal B, Murthy MR, Santi DV, Balaram P. Effect of amino acid substitutions at the subunit interface on the stability and aggregation properties of a dimeric protein: role of Arg 178 and Arg 218 at the Dimer interface of thymidylate synthase. *Proteins*. 1999;34(3):356-68.
159. Perry KM, Pookanjanatavip M, Zhao J, Santi DV, Stroud RM. Reversible dissociation and unfolding of the dimeric protein thymidylate synthase. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1992;1(6):796-800.



160. Lovelace LL, Minor W, Lebioda L. Structure of human thymidylate synthase under low-salt conditions. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2005;61(Pt 5):622-7.
161. Dev IK, Yates BB, Leong J, Dallas WS. Functional role of cysteine-146 in Escherichia coli thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(5):1472-6.
162. Feder JN, Guidos CJ, Kusler B, Carswell C, Lewis D, Schimke RT. A cell cycle analysis of growth-related genes expressed during T lymphocyte maturation. *The Journal of cell biology*. 1990;111(6 Pt 1):2693-701.
163. Storms RK, Ord RW, Greenwood MT, Mirdamadi B, Chu FK, Belfort M. Cell cycle-dependent expression of thymidylate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 1984;4(12):2858-64.
164. Jenh CH, Geyer PK, Johnson LF. Control of thymidylate synthase mRNA content and gene transcription in an overproducing mouse cell line. *Molecular and cellular biology*. 1985;5(10):2527-32.
165. Le Francois BG, Maroun JA, Birnboim HC. Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G(1) event regulated by CDK4 and p16INK4A but not E2F. *British journal of cancer*. 2007;97(9):1242-50.
166. Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, et al. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;4(5):1243-50.
167. Lee Y, Chen Y, Chang LS, Johnson LF. Inhibition of mouse thymidylate synthase promoter activity by the wild-type p53 tumor suppressor protein. *Experimental cell research*. 1997;234(2):270-6.
168. Wood PA, Du-Quiton J, You S, Hrushesky WJ. Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(8):2023-33.
169. Lincoln DW, 2nd, Hrushesky WJ, Wood PA. Circadian organization of thymidylate synthase activity in normal tissues: a possible basis for 5-fluorouracil chronotherapeutic advantage. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;88(3):479-85.
170. Takayanagi A, Kaneda S, Ayusawa D, Seno T. Intron 1 and the 5'-flanking region of the human thymidylate synthase gene as a regulatory determinant of growth-dependent expression. *Nucleic acids research*. 1992;20(15):4021-5.
171. Ash J, Ke Y, Korb M, Johnson LF. Introns are essential for growth-regulated expression of the mouse thymidylate synthase gene. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(3):1565-71.
172. Deng TL, Li Y, Johnson LF. Thymidylate synthase gene expression is stimulated by some (but not all) introns. *Nucleic acids research*. 1989;17(2):645-58.

173. Ke Y, Ash J, Johnson LF. Splicing signals are required for S-phase regulation of the mouse thymidylate synthase gene. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(1):376-83.
174. Dolnick BJ. Cloning and characterization of a naturally occurring antisense RNA to human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic acids research*. 1993;21(8):1747-52.
175. Black AR, Dolnick BJ. Expression of rTS correlates with altered growth regulation of thymidylate synthase. *Cancer research*. 1996;56(4):700-5.
176. Lin SB, Ts'o PO, Sun SK, Choo KB, Yang FY, Lim YP, et al. Inhibition of thymidylate synthase activity by antisense oligodeoxynucleotide and possible role in thymineless treatment. *Molecular pharmacology*. 2001;60(3):474-9.
177. Chu E, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase as an RNA binding protein. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1996;18(3):191-8.
178. Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(20):8977-81.
179. Ju J, Pedersen-Lane J, Maley F, Chu E. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(7):3769-74.
180. Chu E, Takechi T, Jones KL, Voeller DM, Copur SM, Maley GF, et al. Thymidylate synthase binds to c-myc RNA in human colon cancer cells and in vitro. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(1):179-85.
181. Chu E, Copur SM, Ju J, Chen TM, Khleif S, Voeller DM, et al. Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(2):1582-94.
182. Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics*. 1999;58(3):310-2.
183. Acuna M, Eaton L, Cifuentes L, Massardo D. Genetic variants in the enhancer region of the thymidylate synthase gene in the Chilean population. *British journal of clinical pharmacology*. 2006;61(6):778-82.
184. Marsh S, Ameyaw MM, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Human mutation*. 2000;16(6):528.
185. Luo HR, Lu XM, Yao YG, Horie N, Takeishi K, Jorde LB, et al. Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles. *Biochemical genetics*. 2002;40(1-2):41-51.

186. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell structure and function*. 1995;20(3):191-7.
187. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(5):1000-7.
188. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(12):4096-101.
189. Yu KH, Wang WX, Ding YM, Li H, Wang ZS. Polymorphism of thymidylate synthase gene associated with its protein expression in human colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2008;14(4):617-21.
190. Kristensen MH, Weidinger M, Bzorek M, Pedersen PL, Mejer J. Correlation between thymidylate synthase gene variants, RNA and protein levels in primary colorectal adenocarcinomas. *The Journal of international medical research*. 2010;38(2):484-97.
191. Kaneda S, Takeishi K, Ayusawa D, Shimizu K, Seno T, Altman S. Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5'-untranslated region of human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic acids research*. 1987;15(3):1259-70.
192. Zhang YW, Luo HR, Ryder OA, Zhang YP. Evolution of the tandem repeats in thymidylate synthase enhancer region (TSER) in primates. *Gene*. 2004;338(1):47-54.
193. Kealey C, Brown KS, Woodside JV, Young I, Murray L, Boreham CA, et al. A common insertion/deletion polymorphism of the thymidylate synthase (TYMS) gene is a determinant of red blood cell folate and homocysteine concentrations. *Human genetics*. 2005;116(5):347-53.
194. Pullmann R, Jr., Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Ladner RD, Gorospe M. Differential stability of thymidylate synthase 3'-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(33):23456-63.
195. Thomas F, Hoskins JM, Dvorak A, Tan BR, McLeod HL. Detection of the G>C SNP and rare mutations in the 28-bp repeat of TYMS using gel-based capillary electrophoresis. *Pharmacogenomics*. 2010;11(12):1751-6.
196. Gusella M, Bolzonella C, Crepaldi G, Ferrazzi E, Padrini R. A novel G/C single-nucleotide polymorphism in the double 28-bp repeat thymidylate synthase allele. *The pharmacogenomics journal*. 2006;6(6):421-4.
197. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer research*. 2003;63(18):6004-7.

198. Lincz LF, Scorgie FE, Garg MB, Ackland SP. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(9):1930-4.
199. Mandola MV, Stoecklacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer research*. 2003;63(11):2898-904.
200. Goekkurt E, Hoehn S, Wolschke C, Wittmer C, Stueber C, Hossfeld DK, et al. Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS)--novel predictors for response and survival in gastric cancer patients. *British journal of cancer*. 2006;94(2):281-6.
201. Graziano F, Kawakami K, Watanabe G, Ruzzo A, Humar B, Santini D, et al. Association of thymidylate synthase polymorphisms with gastric cancer susceptibility. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;112(6):1010-4.
202. Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, Dulucq S, Moghrabi A. Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *The pharmacogenomics journal*. 2005;5(6):374-80.
203. Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica*. 2003;88(2):159-66.
204. Xu X, Gammon MD, Zhang H, Wetmur JG, Rao M, Teitelbaum SL, et al. Polymorphisms of one-carbon-metabolizing genes and risk of breast cancer in a population-based study. *Carcinogenesis*. 2007;28(7):1504-9.
205. Zhuang W, Wu XT, Zhou Y, Liu GJ, Wu TX, Yao X, et al. Polymorphisms of thymidylate synthase in the 5'- and 3'-untranslated regions and gastric cancer. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54(7):1379-85.
206. Tan W, Miao X, Wang L, Yu C, Xiong P, Liang G, et al. Significant increase in risk of gastroesophageal cancer is associated with interaction between promoter polymorphisms in thymidylate synthase and serum folate status. *Carcinogenesis*. 2005;26(8):1430-5.
207. Zhai X, Gao J, Hu Z, Tang J, Qin J, Wang S, et al. Polymorphisms in thymidylate synthase gene and susceptibility to breast cancer in a Chinese population: a case-control analysis. *BMC cancer*. 2006;6:138.
208. Shi Q, Zhang Z, Neumann AS, Li G, Spitz MR, Wei Q. Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphisms and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(3):649-56.
209. Yuan JM, Lu SC, Van Den Berg D, Govindarajan S, Zhang ZQ, Mato JM, et al. Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes and risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007;46(3):749-58.

210. Zhang Z, Xu Y, Zhou J, Wang X, Wang L, Hu X, et al. Polymorphisms of thymidylate synthase in the 5'- and 3'-untranslated regions associated with risk of gastric cancer in South China: a case-control analysis. *Carcinogenesis*. 2005;26(10):1764-9.
211. Zhang Z, Shi Q, Sturgis EM, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. Thymidylate synthase 5'- and 3'-untranslated region polymorphisms associated with risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(23):7903-10.
212. Zhang J, Cui Y, Kuang G, Li Y, Wang N, Wang R, et al. Association of the thymidylate synthase polymorphisms with esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2479-85.
213. Nomura T, Nakagawa M, Fujita Y, Hanada T, Mimata H, Nomura Y. Clinical significance of thymidylate synthase expression in bladder cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2002;9(7):368-76.
214. Voeller D, Rahman L, Zajac-Kaye M. Elevated levels of thymidylate synthase linked to neoplastic transformation of mammalian cells. *Cell Cycle*. 2004;3(8):1005-7.
215. Hashimoto H, Ozeki Y, Sato M, Obara K, Matsutani N, Nakagishi Y, et al. Significance of thymidylate synthase gene expression level in patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2006;106(7):1595-601.
216. Rahman L, Voeller D, Rahman M, Lipkowitz S, Allegra C, Barrett JC, et al. Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. *Cancer cell*. 2004;5(4):341-51.
217. Bertino JR, Banerjee D. Thymidylate synthase as an oncogene? *Cancer cell*. 2004;5(4):301-2.
218. Cummins RR, Balinsky D. Activities of some enzymes of pyrimidine and DNA synthesis in a rat transplantable hepatoma and human primary hepatomas, in cell lines derived from these tissues, and in human fetal liver. *Cancer research*. 1980;40(4):1235-9.
219. Hillenbrand A, Formentini A, Staib L, Sander S, Salonga D, Danenberg K, et al. A longterm follow-up study of thymidylate synthase as a predictor for survival of patients with liver tumours receiving hepatic arterial infusion chemotherapy. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2004;30(4):407-13.
220. Koga M, Anegawa E, Yoh J, Tsuyama H, Sakaino H, Iwamoto O, et al. Clinical relevance of thymidylate synthase (TS) activity for S-1-based chemotherapy in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2010;48(2):88-93.
221. Kamoshida S, Suzuki M, Shimomura R, Sakurai Y, Komori Y, Uyama I, et al. Immunostaining of thymidylate synthase and p53 for predicting chemoresistance to S-1/cisplatin in gastric cancer. *British journal of cancer*. 2007;96(2):277-83.

222. Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Volkenandt M, Shea LC, Aigner K, et al. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer research*. 1992;52(1):108-16.
223. Ren DN, Kim IY, Koh SB, Chang SJ, Eom M, Yi SY, et al. Comparative analysis of thymidylate synthase at the protein, mRNA, and DNA levels as prognostic markers in colorectal adenocarcinoma. *Journal of surgical oncology*. 2009;100(7):546-52.
224. Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, et al. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2003;12(10):958-62.
225. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2004;159(5):423-43.
226. Gosens MJ, Moerland E, Lemmens VP, Rutten HT, Tan-Go I, van den Brule AJ. Thymidylate synthase genotyping is more predictive for therapy response than immunohistochemistry in patients with colon cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(8):1941-9.
227. Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Bigler J, Caan B, Potter JD, et al. Thymidylate synthase polymorphisms and colon cancer: associations with tumor stage, tumor characteristics and survival. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(10):2226-32.
228. Fernandez-Contreras ME, Sanchez-Hernandez JJ, Guijarro M, Gisbert JP, Rivas N, Garcia de Paredes ML, et al. Influence of thymidylate synthase DNA polymorphisms and gender on the clinical evolution of patients with advanced colorectal cancer. *Oncology reports*. 2010;23(5):1393-400.
229. Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guino E, et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(10):1603-11.
230. Hubner RA, Liu JF, Sellick GS, Logan RF, Houlston RS, Muir KR. Thymidylate synthase polymorphisms, folate and B-vitamin intake, and risk of colorectal adenoma. *British journal of cancer*. 2007;97(10):1449-56.
231. Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD. Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. *Cancer research*. 2002;62(12):3361-4.
232. Popat S, Chen Z, Zhao D, Pan H, Hearle N, Chandler I, et al. A prospective, blinded analysis of thymidylate synthase and p53 expression as prognostic markers in the adjuvant treatment of

- colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2006;17(12):1810-7.
233. Broll R, Busch P, Duchrow M, Oevermann E, Schwandner O, Farke S, et al. Influence of thymidylate synthase and p53 protein expression on clinical outcome in patients with colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*. 2005;20(2):94-102.
234. Aguiar S, Jr., Lopes A, Soares FA, Rossi BM, Ferreira FO, Nakagawa WT, et al. Prognostic and predictive value of the thymidylate synthase expression in patients with non-metastatic colorectal cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2005;31(8):863-8.
235. Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(12):2832-43.
236. Edler D, Hallstrom M, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression: an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(4):1378-84.
237. Garcia V, Garcia JM, Pena C, Silva J, Dominguez G, Hurtado A, et al. Thymidylate synthase messenger RNA expression in plasma from patients with colon cancer: prognostic potential. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(7 Pt 1):2095-100.
238. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, et al. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-fluorouracil and camptothecin. *Cancer research*. 2003;63(24):8791-812.
239. Ricciardiello L, Ceccarelli C, Angiolini G, Pariali M, Chieco P, Paterini P, et al. High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(11):4234-40.
240. Popat S, Wort R, Houlston RS. Inter-relationship between microsatellite instability, thymidylate synthase expression, and p53 status in colorectal cancer: implications for chemoresistance. *BMC cancer*. 2006;6:150.
241. Wong NA, Brett L, Stewart M, Leitch A, Longley DB, Dunlop MG, et al. Nuclear thymidylate synthase expression, p53 expression and 5FU response in colorectal carcinoma. *British journal of cancer*. 2001;85(12):1937-43.
242. Qiu LX, Tang QY, Bai JL, Qian XP, Li RT, Liu BR, et al. Predictive value of thymidylate synthase expression in advanced colorectal cancer patients receiving fluoropyrimidine-based chemotherapy:

- evidence from 24 studies. International journal of cancer Journal international du cancer. 2008;123(10):2384-9.
243. Clark JL, Berger SH, Mittelman A, Berger FG. Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. Cancer treatment reports. 1987;71(3):261-5.
244. Chu E, Grem JL, Johnston PG, Allegra CJ. New Concepts for the Development and Use of Antifolates. Oncologist. 1996;1(4):255-60.
245. Jackman AL, Calvert AH. Folate-based thymidylate synthase inhibitors as anticancer drugs. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 1995;6(9):871-81.
246. Papamichael D. The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status. Oncologist. 1999;4(6):478-87.
247. Lu JW, Gao CM, Wu JZ, Cao HX, Tajima K, Feng JF. Polymorphism in the 3'-untranslated region of the thymidylate synthase gene and sensitivity of stomach cancer to fluoropyrimidine-based chemotherapy. Journal of human genetics. 2006;51(3):155-60.
248. Yawata A, Kim SR, Miyajima A, Kubo T, Ishida S, Saito Y, et al. Polymorphic tandem repeat sequences of the thymidylate synthase gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2005;56(5):465-72.
249. Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(7):1365-9.
250. Marsh S. Thymidylate synthase pharmacogenetics. Investigational new drugs. 2005;23(6):533-7.
251. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2000;6(4):1322-7.
252. Van der Wilt CL, Pinedo HM, Smid K, Peters GJ. Elevation of thymidylate synthase following 5-fluorouracil treatment is prevented by the addition of leucovorin in murine colon tumors. Cancer research. 1992;52(18):4922-8.
253. Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frosing R, Bernstein L, Hayes AA. Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. Cancer research. 1988;48(20):5894-900.
254. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. Cancer research. 1995;55(7):1407-12.



255. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(6):3628-34.
256. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Human molecular genetics*. 1996;5(12):1867-74.
257. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human molecular genetics*. 1996;5(12):1851-8.
258. Matthews RG, Drummond JT, Webb HK. Cobalamin-dependent methionine synthase and serine hydroxymethyltransferase: targets for chemotherapeutic intervention? *Adv Enzyme Regul*. 1998;38:377-92.
259. Goulding CW, Postigo D, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry*. 1997;36(26):8082-91.
260. Banerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1990;4(5):1450-9.
261. Wolthers KR, Toogood HS, Jowitt TA, Marshall KR, Leys D, Scrutton NS. Crystal structure and solution characterization of the activation domain of human methionine synthase. *The FEBS journal*. 2007;274(3):738-50.
262. Matthews RG, Sheppard C, Goulding C. Methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *European journal of pediatrics*. 1998;157 Suppl 2:S54-9.
263. Col B, Oltean S, Banerjee R. Translational regulation of human methionine synthase by upstream open reading frames. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1769(9-10):532-40.
264. Gulati S, Brody LC, Banerjee R. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;259(2):436-42.
265. Oltean S, Banerjee R. A B12-responsive internal ribosome entry site (IRES) element in human methionine synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(38):32662-8.
266. Kolhouse JF, Utley C, Stabler SP, Allen RH. Mechanism of conversion of human apo- to holomethionine synthase by various forms of cobalamin. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(34):23010-5.
267. Jarrett JT, Huang S, Matthews RG. Methionine synthase exists in two distinct conformations that differ in reactivity toward methyltetrahydrofolate, adenosylmethionine, and flavodoxin. *Biochemistry*. 1998;37(16):5372-82.

268. Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R. Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(33):19246-9.
269. Yamada K, Kawata T, Wada M, Isshiki T, Onoda J, Kawanishi T, et al. Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B-12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction. *J Nutr*. 2000;130(8):1894-900.
270. Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(25):9476-81.
271. Wolthers KR, Scrutton NS. Protein interactions in the human methionine synthase-methionine synthase reductase complex and implications for the mechanism of enzyme reactivation. *Biochemistry*. 2007;46(23):6696-709.
272. Fredriksen A, Meyer K, Ueland PM, Vollset SE, Grotmol T, Schneede J. Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism. *Human mutation*. 2007;28(9):856-65.
273. Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Iqbal MP. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PloS one*. 2012;7(3):e33222.
274. Silaste ML, Rantala M, Sampi M, Alfthan G, Aro A, Kesaniemi YA. Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in healthy women. *J Nutr*. 2001;131(10):2643-7.
275. Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, Braga RC, Hirata RD, Hirata MH, et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *European journal of clinical nutrition*. 2008;62(8):1010-21.
276. Chen J, Stampfer MJ, Ma J, Selhub J, Malinow MR, Hennekens CH, et al. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001;154(3):667-72.
277. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer research*. 2002;62(15):4519-24.
278. Jiang Y, Xia X, Wang W, Lin L, Xu C, Cai Z, et al. Hyperhomocysteinemia and related genetic polymorphisms correlate with ulcerative colitis in Chinese Han population in Central China [corrected]. *Cell biochemistry and biophysics*. 2012;62(1):203-10.
279. Ashavaid TF, Shalia KK, Kondkar AA, Todur SP, Nair KG, Nair SR. Gene polymorphism and coronary risk factors in Indian population. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2002;40(10):975-85.

280. Naushad SM, Jain Jamal MN, Prasad CK, Rama Devi AR. Relationship between methionine synthase, methionine synthase reductase genetic polymorphisms and deep vein thrombosis among South Indians. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2008;46(1):73-9.
281. Brustolin S, Giugliani R, Felix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2010;43(1):1-7.
282. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(3):1935-42.
283. Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, et al. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *European journal of human genetics : EJHG*. 2003;11(9):671-8.
284. Smulders YM, Smith DE, Kok RM, Teerlink T, Swinkels DW, Stehouwer CD, et al. Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. *British journal of haematology*. 2006;132(5):623-9.
285. Yu CP, Wu MH, Chou YC, Yang T, You SL, Chen CJ, et al. Breast cancer risk associated with multigenotypic polymorphisms in folate-metabolizing genes: a nested case-control study in Taiwan. *Anticancer research*. 2007;27(3B):1727-32.
286. Marchal C, Redondo M, Reyes-Engel A, Perea-Milla E, Gaitan MJ, Machuca J, et al. Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and risk of prostate cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2008;34(7):805-10.
287. Naushad SM, Pavani A, Rupasree Y, Divyaa S, Deepti S, Digumarti RR, et al. Association of aberrations in one-carbon metabolism with molecular phenotype and grade of breast cancer. *Molecular carcinogenesis*. 2012;51 Suppl 1:E32-41.
288. Ma E, Iwasaki M, Junko I, Hamada GS, Nishimoto IN, Carvalho SM, et al. Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC cancer*. 2009;9:122.
289. Fang JY, Xiao SD. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. *Journal of gastroenterology*. 2003;38(9):821-9.
290. Chen M, Peyrin-Biroulet L, Xia B, Gueant-Rodriguez RM, Bronowicki JP, Bigard MA, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. *BMC medical genetics*. 2008;9:78.

291. Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, Ben Slama MR, Sfaxi M, Ayed M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms and risk of bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2007;176(1):48-53.
292. Kruszyna L, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter K, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. *Molecular biology reports*. 2010;37(1):241-7.
293. Skibola CF, Forrest MS, Coppede F, Agana L, Hubbard A, Smith MT, et al. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;104(7):2155-62.
294. Klerk M, Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ, den Heijer M, Schouten EG, et al. The 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. *Thrombosis research*. 2003;110(2-3):87-91.
295. Suzuki T, Matsuo K, Sawaki A, Mizuno N, Hiraki A, Kawase T, et al. Alcohol drinking and one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on pancreatic cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008;17(10):2742-7.
296. Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, Ogura M, Kagami Y, Taji H, et al. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood*. 2001;97(10):3205-9.
297. Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Chanock SJ, Peplonska B, Welch R, et al. Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: a population-based case-control study and meta-analyses. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(12):2696-703.
298. Linnebank M, Schmidt S, Kolsch H, Linnebank A, Heun R, Schmidt-Wolf IG, et al. The methionine synthase polymorphism D919G alters susceptibility to primary central nervous system lymphoma. *British journal of cancer*. 2004;90(10):1969-71.
299. Shekari M, Sobti RC, Kordi Tamandani DM, Suri V. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) codon (677) and methionine synthase (MS) codon (2756) on risk of cervical carcinogenesis in North Indian population. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2008;278(6):517-24.
300. Lu M, Wang F, Qiu J. Methionine synthase A2756G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 18,953 subjects. *Breast cancer research and treatment*. 2010;123(1):213-7.
301. Kim HN, Kim YK, Lee IK, Lee JJ, Yang DH, Park KS, et al. Polymorphisms involved in the folate metabolizing pathway and risk of multiple myeloma. *American journal of hematology*. 2007;82(9):798-801.

302. Semmler A, Simon M, Moskau S, Linnebank M. The methionine synthase polymorphism c.2756A>G alters susceptibility to glioblastoma multiforme. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15(11):2314-6.
303. Yu K, Zhang J, Dou C, Gu S, Xie Y, Mao Y, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *European journal of human genetics : EJHG*. 2010;18(3):370-8.
304. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1999;8(9):825-9.
305. Goode EL, Potter JD, Bigler J, Ulrich CM. Methionine synthase D919G polymorphism, folate metabolism, and colorectal adenoma risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2004;13(1):157-62.
306. Yoshimitsu S, Morita M, Hamachi T, Tabata S, Abe H, Tajima O, et al. Methionine synthase and thymidylate synthase gene polymorphisms and colorectal adenoma risk: the self defense forces study. *Molecular carcinogenesis*. 2012;51 Suppl 1:E151-7.
307. Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Sakamoto H, Yoshida T, Tsugane S. Methionine synthase A2756G polymorphism interacts with alcohol and folate intake to influence the risk of colorectal adenoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(1):267-74.
308. Barak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Methionine synthase. a possible prime site of the ethanolic lesion in liver. *Alcohol*. 2002;26(2):65-7.
309. Kenyon SH, Nicolaou A, Gibbons WA. The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro. *Alcohol*. 1998;15(4):305-9.
310. Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. *Alcohol*. 2005;35(3):235-41.
311. Badner NH, Drader K, Freeman D, Spence JD. The use of intraoperative nitrous oxide leads to postoperative increases in plasma homocysteine. *Anesthesia and analgesia*. 1998;87(3):711-3.
312. Horne DW, Holloway RS. Compartmentation of folate metabolism in rat pancreas: nitrous oxide inactivation of methionine synthase leads to accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in cytosol. *J Nutr*. 1997;127(9):1772-5.
313. Frasca V, Riazzi BS, Matthews RG. In vitro inactivation of methionine synthase by nitrous oxide. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(34):15823-6.

314. Deacon R, Lumb M, Perry J, Chanarin I, Minty B, Halsey M, et al. Inactivation of methionine synthase by nitrous oxide. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1980;104(2):419-23.
315. Danishpajoo IO, Gudi T, Chen Y, Kharitonov VG, Sharma VS, Boss GR. Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(29):27296-303.
316. Matsuo K, Ito H, Wakai K, Hirose K, Saito T, Suzuki T, et al. One-carbon metabolism related gene polymorphisms interact with alcohol drinking to influence the risk of colorectal cancer in Japan. *Carcinogenesis*. 2005;26(12):2164-71.
317. Suzuki T, Matsuo K, Hasegawa Y, Hiraki A, Wakai K, Hirose K, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: case-control study. *Cancer science*. 2007;98(9):1439-46.
318. Koushik A, Kraft P, Fuchs CS, Hankinson SE, Willett WC, Giovannucci EL, et al. Nonsynonymous polymorphisms in genes in the one-carbon metabolism pathway and associations with colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15(12):2408-17.
319. Lin J, Spitz MR, Wang Y, Schabath MB, Gorlov IP, Hernandez LM, et al. Polymorphisms of folate metabolic genes and susceptibility to bladder cancer: a case-control study. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1639-47.
320. Hovde O, Moum BA. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(15):1723-31.
321. Baumgart DC, Bernstein CN, Abbas Z, Colombel JF, Day AS, D'Haens G, et al. IBD Around the world: comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: proceedings of the World Digestive Health Day 2010--Inflammatory Bowel Disease Task Force meeting. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(2):639-44.
322. Ahuja V, Tandon RK. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. *Journal of digestive diseases*. 2010;11(3):134-47.
323. Michel P, St-Onge L, Lowe AM, Bigras-Poulin M, Brassard P. Geographical variation of Crohn's disease residual incidence in the Province of Quebec, Canada. *International journal of health geographics*. 2010;9:22.
324. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12 Suppl 1:S3-9.
325. Yapp TR, Stenson R, Thomas GA, Lawrie BW, Williams GT, Hawthorne AB. Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2000;12(8):907-11.

326. Gheorghe C, Pascu O, Gheorghe L, Iacob R, Dumitru E, Tantau M, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in Romania: a multicentre study. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2004;16(11):1153-9.
327. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(3):254-61.
328. Magro F, Portela F, Lago P, Deus J, Vieira A, Peixe P. Avaliação Nacional dos doentes com Doença de Crohn. *Jornal Português de Gastreenterologia*. 2007;14.
329. Duricova D, Pedersen N, Elkjaer M, Gomborg M, Munkholm P, Jess T. Overall and cause-specific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studies. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(2):347-53.
330. Canavan C, Abrams KR, Mayberry JF. Meta-analysis: mortality in Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;25(8):861-70.
331. Loftus EV, Jr., Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology*. 1998;114(6):1161-8.
332. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, Elkjaer M, et al. Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(6):1274-82.
333. Latella G, Papi C. Crucial steps in the natural history of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(29):3790-9.
334. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001;49(6):777-82.
335. Papi C, Festa V, Fagnani C, Stazi A, Antonelli G, Moretti A, et al. Evolution of clinical behaviour in Crohn's disease: predictive factors of penetrating complications. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2005;37(4):247-53.
336. Vatn MH. Natural history and complications of IBD. *Current gastroenterology reports*. 2009;11(6):481-7.
337. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94.
338. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of

- a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie. 2005;19 Suppl A:5-36.
339. Beattie RM, Croft NM, Fell JM, Afzal NA, Heuschkel RB. Inflammatory bowel disease. Archives of disease in childhood. 2006;91(5):426-32.
340. Ephgrave K. Extra-intestinal manifestations of Crohn's disease. The Surgical clinics of North America. 2007;87(3):673-80.
341. Lambert D, Benhayoun S, Adjalla C, Gelot MA, Renkes P, Felden F, et al. Crohn's disease and vitamin B12 metabolism. Digestive diseases and sciences. 1996;41(7):1417-22.
342. Koutroubakis IE, Dilaveraki E, Vlachonikolis IG, Vardas E, Vrentzos G, Ganotakis E, et al. Hyperhomocysteinemia in Greek patients with inflammatory bowel disease. Digestive diseases and sciences. 2000;45(12):2347-51.
343. Kallel L, Feki M, Sekri W, Segheir L, Fekih M, Boubaker J, et al. Prevalence and risk factors of hyperhomocysteinemia in Tunisian patients with Crohn's disease. Journal of Crohn's & colitis. 2011;5(2):110-4.
344. Casella G, Antonelli E, Di Bella C, Di Marco E, Piatti M, Villanacci V, et al. Hyperhomocysteinemia in patients with Crohn's disease. Techniques in coloproctology. 2013.
345. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, et al. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. The American journal of gastroenterology. 2003;98(1):112-7.
346. Bernstein CN. Is hyperhomocysteinemia associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease? Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology. 2007;4(10):550-1.
347. Younes-Mhenni S, Derex L, Berruyer M, Nighoghossian N, Philippeau F, Salzmann M, et al. Large-artery stroke in a young patient with Crohn's disease. Role of vitamin B6 deficiency-induced hyperhomocysteinemia. Journal of the neurological sciences. 2004;221(1-2):113-5.
348. Phelip JM, Ducros V, Faucheron JL, Flourie B, Roblin X. Association of hyperhomocysteinemia and folate deficiency with colon tumors in patients with inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel diseases. 2008;14(2):242-8.
349. Vatn MH. Mucosal healing: impact on the natural course or therapeutic strategies. Dig Dis. 2009;27(4):470-5.
350. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lemann M, Colombel JF. Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2010;7(1):15-29.



351. Heuschkel RB, Menache CC, Megerian JT, Baird AE. Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn's disease in children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;31(1):8-15.
352. Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, Thomsen OO. Corticosteroids for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001(3):CD000301.
353. Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000(2):CD000545.
354. Pearson DC, May GR, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000(2):CD000067.
355. Danese S, Colombel JF, Reinisch W, Rutgeerts PJ. Review article: infliximab for Crohn's disease treatment--shifting therapeutic strategies after 10 years of clinical experience. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;33(8):857-69.
356. Kamm MA, Ng SC, De Cruz P, Allen P, Hanauer SB. Practical application of anti-TNF therapy for luminal Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(11):2366-91.
357. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Annals of surgery*. 2000;231(1):38-45.
358. Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(2):105-18.
359. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 2009;10:89-116.
360. Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(1):15-24.
361. Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, et al. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(5):412-24.
362. Cho JH, Abraham C. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annual review of medicine*. 2007;58:401-16.
363. Ng SC, Tsoi KK, Kamm MA, Xia B, Wu J, Chan FK, et al. Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. *Inflammatory bowel diseases*. 2012;18(6):1164-76.
364. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(12):2393-404.

365. Pugazhendhi S, Amte A, Balamurugan R, Subramanian V, Ramakrishna BS. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 2008;27(5):201-3.
366. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2003;17(12):1465-70.
367. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123(1):86-91.
368. Kaser A, Blumberg RS. Adaptive immunity in inflammatory bowel disease: state of the art. *Current opinion in gastroenterology*. 2008;24(4):455-61.
369. Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, et al. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(5):511-5.
370. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
371. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009;58(8):1152-67.
372. Dong Y, Undyala VV, Gottlieb RA, Mentzer RM, Jr., Przyklenk K. Autophagy: definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2010;15(3):220-30.
373. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*. 2007;39(5):596-604.
374. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics*. 2007;39(2):207-11.
375. Vecchi M, Sacchi E, Saibeni S, Meucci G, Tagliabue L, Duca F, et al. Inflammatory bowel diseases are not associated with major hereditary conditions predisposing to thrombosis. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45(7):1465-9.
376. Toruner M, Erkan O, Soykan I, Bozdayi M, Cetinkaya H, Yurdaydin C, et al. Factor V Leiden, prothrombin G20210A and MTHFR gene mutations in inflammatory bowel disease. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2004;15(4):250-2.

377. Yasa MH, Bolaman Z, Yukselen V, Kadikoylu G, Karaoglul AO, Batun S. Factor V Leiden G1691A, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in Turkish inflammatory bowel disease patients. *Hepato-gastroenterology*. 2007;54(77):1438-42.
378. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, et al. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2007;5(8):972-6.
379. Gazouli M, Pachoula I, Panayotou I, Mantzaris G, Chrousos G, Anagnou NP, et al. NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16(14):1753-8.
380. Essers JB, Lee JJ, Kugathasan S, Stevens CR, Grand RJ, Daly MJ. Established genetic risk factors do not distinguish early and later onset Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(10):1508-14.
381. Barreiro-de Acosta M, Pena AS. Clinical applications of NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. *Acta gastroenterologica Latinoamericana*. 2007;37(1):49-54.
382. Guagnozzi D, Cossu A, Viscido A, Corleto V, Annese V, Latiano A, et al. Acute intestinal obstruction and NOD2/CARD15 mutations among Italian Crohn's disease patients. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2004;8(5):179-85.
383. Buruiana FE, Sola I, Alonso-Coello P. Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(11):CD005109.
384. Niederau C, Backmerhoff F, Schumacher B. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology*. 1997;44(13):90-107.
385. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1756-67.
386. Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugala I, Wasilewska A, Drews M, Majewski P, et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2009;57(4):291-4.
387. Gonzalez S, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Fuentes D, Nino P, et al. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(5):1101-6.
388. Han Z, Li C, Han S, Han Y, Qiu J, Shi Y, et al. Meta-analysis: polymorphisms in TNF-alpha gene promoter and Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2010;32(2):159-70.
389. Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Scholmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1992;102(2):514-9.

390. Guerreiro CS, Ferreira P, Tavares L, Santos PM, Neves M, Brito M, et al. Fatty acids, IL6, and TNFalpha polymorphisms: an example of nutrigenetics in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 2009;104(9):2241-9.
391. Mardini HE, Gregory KJ, Nasser M, Selby L, Arsenescu R, Winter TA, et al. Gastroduodenal Crohn's disease is associated with NOD2/CARD15 gene polymorphisms, particularly L1007P homozygosity. *Digestive diseases and sciences*. 2005;50(12):2316-22.
392. Amre DK, Mack DR, Morgan K, Israel D, Lambrette P, Costea I, et al. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2009;29(9):1025-31.
393. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1665-71.
394. Schwab M, Schaffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, et al. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*. 2002;12(6):429-36.
395. Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut*. 2002;51(2):143-6.
396. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2004;75(1):13-33.
397. Mendoza JL, Urcelay E, Lana R, Martin MC, Lopez N, Guijarro LG, et al. MDR1 polymorphisms and response to azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2007;13(5):585-90.
398. Cabre E, Domenech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(29):3814-22.
399. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2006;81(11):1462-71.
400. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut*. 1988;29(3):352-7.
401. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(6):848-59.
402. Miller LG, Goldstein G, Murphy M, Ginns LC. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Chest*. 1982;82(5):526-9.
403. Barton JR, Riad MA, Gaze MN, Maran AG, Ferguson A. Mucosal immunodeficiency in smokers, and in patients with epithelial head and neck tumours. *Gut*. 1990;31(4):378-82.

404. Scott AM, Kellow JE, Eckersley GM, Nolan JM, Jones MP. Cigarette smoking and nicotine delay postprandial mouth-cecum transit time. *Digestive diseases and sciences*. 1992;37(10):1544-7.
405. Srivastava ED, Russell MA, Feyerabend C, Rhodes J. Effect of ulcerative colitis and smoking on rectal blood flow. *Gut*. 1990;31(9):1021-4.
406. Nowak J, Murray JJ, Oates JA, FitzGerald GA. Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation*. 1987;76(1):6-14.
407. Nos P, Domenech E. Management of Crohn's disease in smokers: is an alternative approach necessary? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(31):3567-74.
408. Holdstock G, Savage D, Harman M, Wright R. Should patients with inflammatory bowel disease smoke? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;288(6414):362.
409. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1996;110(2):424-31.
410. Lindberg E, Jarnerot G, Huitfeldt B. Smoking in Crohn's disease: effect on localisation and clinical course. *Gut*. 1992;33(6):779-82.
411. Picco MF, Bayless TM. Tobacco consumption and disease duration are associated with fistulizing and stricturing behaviors in the first 8 years of Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(2):363-8.
412. Chapman-Kiddell CA, Davies PS, Gillen L, Radford-Smith GL. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(1):137-51.
413. Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG. Increased sugar consumption in Crohn's disease. *Digestion*. 1980;20(5):323-6.
414. Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, et al. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 1998;10(3):243-9.
415. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflammatory bowel diseases*. 2005;11(2):154-63.
416. Ludwig DS. Diet and development of the insulin resistance syndrome. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2003;12 Suppl:S4.
417. Riordan AM, Ruxton CH, Hunter JO. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *European journal of clinical nutrition*. 1998;52(4):229-38.
418. Thornton JR, Emmett PM, Heaton KW. Diet and Crohn's disease: characteristics of the pre-illness diet. *British medical journal*. 1979;2(6193):762-4.

419. Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Molecular nutrition & food research*. 2005;49(6):601-8.
420. Venkatraman A, Ramakrishna BS, Shaji RV, Kumar NS, Pulimood A, Patra S. Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat shock protein 70 and NF-kappaB. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;285(1):G177-84.
421. Kasper H, Sommer H. Dietary fiber and nutrient intake in Crohn's disease. *The American journal of clinical nutrition*. 1979;32(9):1898-901.
422. Zamaria N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reproduction, nutrition, development*. 2004;44(3):273-82.
423. Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2002;56(8):388-96.
424. Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Zeitschrift fur Rheumatologie*. 1991;50 Suppl 1:3-6.
425. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*. 2010;2(3):355-74.
426. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(44):43807-17.
427. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American journal of gastroenterology*. 2011;106(4):563-73.
428. Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *The American journal of clinical nutrition*. 1996;63(5):741-5.
429. Innis SM, Jacobson K. Dietary lipids in early development and intestinal inflammatory disease. *Nutrition reviews*. 2007;65(12 Pt 2):S188-93.
430. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(3 Suppl):560S-9S.

## **II. OBJECTIVOS**

O objectivo geral desta tese consistiu na avaliação da influência de alterações em genes do ciclo do folato, bem como de variáveis nutricionais, no desenvolvimento de cancro colo-rectal (CCR) e em Doença de Crohn (DC). Para tal foi efectuado um estudo de vários genes do ciclo do folato, mas que incidiu especialmente nos genes da timidilato sintetase (TYMS) e da metionina sintetase (MTR), bem como um estudo do padrão alimentar dos indivíduos com estas patologias. Foi ainda avaliada a interacção entre os factores genéticos e nutricionais no surgimento e desenvolvimento das doenças em estudo.

Para cumprir este objectivo foram desenvolvidos quatro estudos distintos cujos objectivos específicos se encontram descritos a seguir.

### ***Cancro Colo-rectal***

Através da análise de duas populações, uma de pacientes com CCR e uma população controlo, procedeu-se à realização de três estudos distintos que pretendiam cumprir os seguintes objectivos:

#### Estudo 1

- Estudar a prevalência do polimorfismo *MTR A2756G*
- Analisar o genótipo de três polimorfismos localizados em genes do ciclo do folato (*MTHFR C677T*, *MTR A2756G* e *SHMT C1420T*) com especial relevância para o polimorfismo *MTR A2756G* e sua associação com o risco de CCR;
- Avaliar o padrão alimentar dos indivíduos com CCR, com particular incidência nos nutrientes envolvidos no ciclo do folato (folato, metionina, glicina, vitamina B6, vitamina B12, álcool);
- Avaliar a influência da interacção da ingestão de nutrientes e as variáveis genéticas no risco de CCR.

#### Estudo 2

- Estudar a prevalência de dois polimorfismos do gene TYMS (deleção de 6pb e repetição de 28pb)
- Analisar o genótipo destes polimorfismos do gene TYMS e a sua associação com o risco de CCR;
- Avaliar a influência da interacção da ingestão de nutrientes e as variáveis genéticas no risco de CCR.

### Estudo 3

- Analisar a expressão relativa em tumores e tecidos normais adjacentes de quatro genes do ciclo do folato (MTR; TYMS; SHMT1; MTHFR);
- Correlacionar os níveis de expressão com o desenvolvimento das células tumorais;
- Estudar a influência de diferentes polimorfismos (*MTR A2756G*; *MTHFR C677T*; *SHMT1 C1420T*; *TYMS deleção 6pb*; *TYMS repetição 28pb*) nos níveis de expressão;
- Pesquisar a existência e expressão de transcritos alternativos;
- Avaliar a possível interacção dos níveis de expressão dos diferentes genes em células tumorais.

### ***Doença de Crohn***

No estudo da Doença de Crohn foi realizado um estudo caso-controlo, onde avaliámos uma população de pacientes com DC e uma população controlo com os seguintes objectivos:

### Estudo 4

- Estudar a prevalência do polimorfismo *MTR A2756G*
- Analisar o genótipo deste polimorfismo e a sua associação com o risco de desenvolver DC;
- Avaliar o padrão alimentar dos indivíduos com DC, com particular incidência nos nutrientes envolvidos no ciclo do folato (folato, metionina, glicina, vitamina B6, vitamina B12, álcool);
- Avaliar a influência da interacção da ingestão de nutrientes e as variáveis genéticas no risco de DC.



## **CAPÍTULO 2**

---



**I. ESTUDO 1 – Risco de Cancro Colo-Rectal associado ao polimorfismo C677T da 5,10-Metilenotetrahidofolato Reductase, em pacientes Portugueses, depende da ingestão de nutrientes dadores de grupos metilo<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> *“Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients”*

American Journal of Clinical Nutrition 2008;88(5):1413-8



## **RESUMO**

**Introdução:** Os polimorfismos localizados em genes envolvidos no metabolismo do folato e alguns nutrientes relacionados com o metabolismo do grupo metilo estão implicados no cancro colo-rectal (CCR).

**Objectivo:** Investigámos a associação de 3 polimorfismos genéticos MTHFR C677T (metilenotetrahidrofolato reductase), MTR A2756G (metionina sintetase), e SHMT C1420T (serina hidroximetiltransferase) com a ingestão de nutrientes dadores de grupos metil no risco de CCR.

**Metodologia:** Foi estudada a ingestão de nutrientes dadores de grupos metil e os 3 polimorfismos em indivíduos com CCR (n=196) e controlos saudáveis (n=200), com distribuição semelhante para a idade e género.

**Resultados:** Com excepção da ingestão de folato, que foi significativamente inferior nos doentes ( $P = 0,02$ ), não se observaram diferenças entre os grupos na ingestão de outros nutrientes dadores de grupos metilo. O elevado consumo de folato ( $>406,7 \mu\text{g}/\text{dia}$ ) foi associado a um risco significativamente menor de CCR (odds ratio: 0,67; IC 95%: 0,45-0,99). O polimorfismo MTR A2756G não estava associado ao risco de desenvolver CCR. Em contraste, indivíduos homozigóticos para a variante (TT) do MTHFR C677T, apresentaram um risco 3 vezes superior de CCR (IC 95%: 1,3-6,7). Do mesmo modo, a homozigotia para o polimorfismo SHMT C1420T também revelou um aumento de 2,6 vezes no risco de desenvolver CCR (IC 95%: 1,1-5,9). Quando foram estudadas as interações entre variáveis, o consumo reduzido de todos os nutrientes dadores de grupos metilo estava associado a um aumento de risco de CCR nos participantes homozigóticos para o polimorfismo MTHFR C677T, mas apenas foi observada uma interacção estatisticamente significativa no folato (odds ratio: 14,0; IC 95%: 1,8-108,5). Não se verificou nenhuma associação significativa com os polimorfismos MTR ou SHMT.

**Conclusão:** Estes resultados revelam uma associação entre a variante MTHFR C677T e a ingestão de folato no risco de CCR.

## **INTRODUÇÃO**

O cancro colo-rectal (CCR) é uma patologia complexa que envolve múltiplos factores genéticos e nutricionais (1). No que se refere aos factores nutricionais, foi demonstrado que o folato desempenha um papel preventivo na carcinogénese colo-rectal, provavelmente pelo seu envolvimento no processo de metilação e síntese de DNA (2). Outros nutrientes como a metionina, a vitamina B6, e a vitamina B12, que interagem metabolicamente com o folato neste processo, poderão igualmente influenciar o risco de CCR (3). Nalguns desses estudos, a associação inversa observada entre os níveis de folato e o risco de CCR era modificada pelos polimorfismos genéticos das enzimas envolvidas no metabolismo do folato, em especial na metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR). A substituição C677T no gene MTHFR, que converte a alanina em valina, resulta numa enzima termolábil com reduzida actividade (4). Vários estudos demonstraram que esta variante (TT) está associada a um risco diminuído de CCR, mas apenas quando o nível de folato está normal ou elevado. Tal como descrito por Crott e Mason (4), o polimorfismo da MTHFR é possivelmente o único polimorfismo genético conhecido que alterna entre ser factor de risco ou protector, dependendo dos níveis de nutrientes. Para além disso, porque o metabolismo do folato envolve a interacção de diferentes formas co-enzimáticas da vitamina em múltiplos ciclos, assim como mecanismos de *feedback* entre ciclos, é também importante estudar a influência conjunta que outros polimorfismos de genes envolvidos nestes ciclos possam exercer. A metionina sintetase requer, como co-factor, a presença de vitamina B12, na forma de metilcobalamina. Foi descrita uma variante neste gene, A2756G, que resulta na substituição do aspartato por glicina. São inconsistentes os resultados de estudos na neoplasia colo-rectal; alguns revelam que o genótipo GG está associado a uma diminuição do risco de CCR (5,6), outros mostram um possível aumento no risco de adenomas colo-rectais (7). Nestes estudos não foram analisadas associações com a dieta. A serina hidroximetiltransferase (SHMT) é uma enzima dependente da piridoxina (vitamina B6). Foi identificado um polimorfismo, C1420T, que resulta da substituição do aminoácido leucina por fenilalanina. O significado funcional deste polimorfismo não é ainda conhecido. Apenas um único estudo avaliou a influência que este polimorfismo possa ter no risco de CCR, e nenhuma associação foi encontrada. Mais uma vez, não foi examinada a associação com a ingestão dietética (8). Assim, o objectivo deste estudo caso-controlo foi avaliar o papel destes polimorfismos no risco de CCR tanto de forma isolada como em associação com a ingestão de nutrientes específicos e outros genótipos.

## **MÉTODOS E POPULAÇÃO**

### ***População em estudo***

Os participantes do estudo foram anteriormente descritos (9). De forma resumida, tratou-se de um estudo caso-controlo, realizado no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco

Gentil EPE. Este estudo foi aprovado pelo Comité Científico de Ética do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil EPE, e todos os doentes e controlos forneceram o seu consentimento informado por escrito para participarem no estudo.

O grupo de doentes incluiu 196 indivíduos com diagnóstico histológico de CCR [104 homens, 92 mulheres; idade (média  $\pm$  desvio padrão): 64,2  $\pm$  11,3 anos)], enquanto o grupo controlo incluiu 200 indivíduos saudáveis, dadores de sangue ou voluntários recrutados do mesmo Instituto, com distribuição semelhante por género e idade (106 homens, 94 mulheres; idade média: 62,2  $\pm$  12,1 anos), e sem história prévia de cancro em nenhuma localização. Não foi realizada colonoscopia aos controlos para excluir hipótese de CCR, mas nenhum indivíduo apresentava sintomas da patologia nem anemia. Dos casos, 169 dos 196 (86,5%) tinham um diagnóstico recente de CCR, e os restantes 27 (13,5%) estavam sob tratamento por recidiva da doença. No que diz respeito a terapêuticas anteriores, 119 dos 196 (60,7%) não tinham recebido nenhuma forma de tratamento, 28 dos 196 (14,3%) já tinham sido submetidos a cirurgia, 13 dos 196 (6,6%) tinham sido sujeitos a radioterapia pélvica, 11 dos 196 (5,6%) tinham sido submetidos a um ou mais ciclos de quimioterapia, e 25 dos 196 (12,8%) tinham sido sujeitos a uma combinação de tratamentos. Segundo a classificação Tumor – Nódulos – Metástases, os estadios eram: estadio I, 24 de 178 (13,5%); estadio II, 64 de 178 (35,9%); estadio III, 53 de 178 (29,8%); estadio IV, 37 de 178 (20,8%).

#### ***Avaliação da ingestão nutricional***

Para quantificação da ingestão de folato, vitamina B6, vitamina B12, glicina, metionina, serina, e álcool, foi utilizado o questionário de frequência alimentar validado para a população portuguesa (10). Foi solicitado aos participantes que recordassem os seus hábitos alimentares, no caso dos doentes relativamente ao ano anterior ao diagnóstico de CCR, no caso dos controlos relativamente ao ano anterior à entrevista. Imagens coloridas da maioria dos itens alimentares, revelando 3 porções diferentes, assim como medidas práticas de chávenas e colheres foram utilizadas para facilitar a quantificação da ingestão. O tipo e quantidade de alimentos ingeridos foram então analisados através da versão modificada da base de dados do software *Food Processor*, versão 7 (ESHA Research, Inc, Salem, OR) onde estão incluídos alguns itens de alimentos portugueses, o que permite a quantificação dos diferentes macro e micronutrientes. Os valores de nutrientes foram calculados a partir de alimentos e suplementos (11 dos 196 doentes e nenhum dos controlos tomavam suplementos). A actividade física no ano anterior ao diagnóstico de cancro, nos doentes, ou no ano anterior à entrevista, nos controlos, foi avaliada através do questionário de Arroll (11), que permitiu agrupar os indivíduos em 3 níveis diferentes: baixa (0), intermédia (1) e elevada (2). Os hábitos tabágicos foram avaliados pelo número de cigarros/dia.

### **Processo de Genotipagem**

Foram colhidas amostras de sangue total e armazenadas em cartões *Cards Kit* 3-mm. A extracção de DNA foi realizada utilizando *Generation Capture Card Kit-DNA Purification, DNA Elution* (Gentra Systems Inc, Minneapolis, MN). O polimorfismo GAC/GTC no codão 677 do gene *MTHFR* e o polimorfismo A2756G do gene *MTR* (5,10-metilenotetrahidrofolato reductase) foram genotipados utilizando *Assays-by-Design TaqMan* para análise de discriminação alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA). O polimorfismo C1420T do gene *SHMT* foi genotipado com sondas TaqMan desenhadas com o software *Beacon Designer 5.0* (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). Foram utilizadas sondas para o alelo C (CAGAGGGAAGAGAGAGGCGAAGC), para o alelo T (CAGAGGGAAGAAAGAGGCGAAGC), para o primer forward (GAAAGAGTTCAAGGAGAGACT), e para o primer reverse (CTCCTTTAGAAGTCAGGCAG). A reacção em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) foi realizada com a mistura de: 4 µl de DNA genómico, 10 µl de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de 20x assay mix e ddH<sub>2</sub>O até perfazer 20 µl de volume final. Foi usado o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação a 95°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 92°C durante 15 s, e emparelhamento e extensão a 60°C durante 1 min. Todas as reacções foram realizadas no *iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad, Hercules, CA). Após PCR, o genótipo de cada amostra foi atribuído automaticamente pelo software do equipamento, através da medida da fluorescência específica de cada alelo. Os indivíduos foram classificados em homozigóticos para a variante se possuísem 2 alelos mutados, heterozigóticos se possuísem apenas um alelo mutado, e por fim homozigóticos *wild-type* quando não tinham qualquer alelo mutado. Quando analisada a interacção entre as variáveis genéticas e nutricionais, foi utilizado o valor da mediana para cada nutriente. Para a maioria dos nutrientes, a percentagem de indivíduos (casos e controlos) que ingeriu a dose recomendada de ingestão foi superior a 80%, pelo que não utilizámos os valores da dose recomendada de ingestão mas sim da mediana de consumo.

### **Métodos estatísticos**

A análise estatística foi realizada através do software *SPSS* versão 15.0 para *Windows* (SPSS Inc, Chicago, IL). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, como número (e percentagem) de indivíduos, ou como odds ratio (OR) com IC de 95%. A análise bivariada foi realizada utilizando o teste t de Student ou teste Mann-Whitney para variáveis contínuas, e o teste qui-quadrado para variáveis categóricas. Foi usada regressão logística múltipla para avaliar as variáveis relacionadas com o risco de CCR. A significância das interacções foi calculada através do teste *likelihood ratio* comparando o modelo de interacção com outro contendo apenas o efeito de 2 variáveis. O nível de significância foi estabelecido para um  $P < 0,05$ .



## **RESULTADOS**

### ***Características da população e estilos de vida***

Ambos os grupos eram semelhantes na distribuição por idade e género. Alguns doentes (23%) apresentaram história familiar positiva de CCR em primeiro ou segundo grau, contrastando com apenas 8% da população controlo ( $P < 0,001$ ; OR: 3,4; IC 95%: 1,85-6,29). Não foram identificadas diferenças nos hábitos tabágicos entre os grupos ( $P > 0,05$ ); mas os doentes, quando comparados com os controlos, apresentaram um índice de massa corporal significativamente inferior (em kg/m<sup>2</sup>:  $25,6 \pm 4,2$  comparado com  $27,0 \pm 3,9$ ,  $P = 0,01$ ) e eram significativamente menos activos ( $P = 0,001$ ). Contudo, o exercício por si não influenciou o risco de desenvolver CCR (OR: 0,78; IC 95%: 0,53-1,1).

### ***Avaliação da ingestão nutricional***

A ingestão nutricional diária de folato, vitamina B12 e B6, glicina, metionina, serina e álcool é apresentada na Tabela 1. Não se verificaram diferenças significativas entre casos e controlos, excepto no consumo de folato que foi significativamente inferior nos doentes ( $P = 0,02$ ). Analisando o risco associado à ingestão deste nutriente, observámos um risco (OR) de 0,67 (IC 95%: 0,45-0,99) para os indivíduos com elevada ingestão de folato ( $> 406,7 \mu\text{g}/\text{dia}$ ). O consumo de álcool foi superior nos doentes, mas a diferença não atingiu significado estatístico, uma vez que 35,2% dos doentes e 38,5% dos controlos não consumia qualquer tipo de bebida alcoólica. No entanto, se considerarmos apenas os consumidores de ambos os grupos, observámos que a ingestão média diária era significativamente superior nos doentes do que nos controlos: 38,8g/d vs 31,0 g/d, respectivamente (OR: 1,97; IC 95%: 1,19-3,26). Ao analisarmos a influência conjunta de 2 ou mais nutrientes na modulação do risco de CCR, não foi verificada nenhuma interacção entre variáveis, excepto para o elevado consumo de álcool que em combinação com baixa ingestão de folato, foi associado a um aumento marginal no risco de desenvolver CCR (OR: 1,47; IC 95%: 0,94-2,30;  $P = 0,08$ ).

**Tabela 1** – Ingestão nutricional diária dos participantes<sup>1</sup>

	<b>Casos (n=196)</b>	<b>Controlos (n=200)</b>	<b>P</b>	<b>OR (IC 95%)<sup>2</sup></b>
Vitamina B6 (mg/d)	2,83 ± 1,06 <sup>3</sup>	2,85 ± 0,98	NS	0,77 (0,50-1,14)
Vitamina B12 (µg/d)	14,5 ± 9,1	14,3 ± 8,23	NS	0,98 (0,66-1,45)
Folato (µg /d)	401,6 ± 161,9	434,3 ± 161,3	0,02	0,67 (0,45-0,99)
Glicina (mg/d)	5,39 ± 2,8	5,10 ± 2,34	NS	1,00 (0,68-1,50)
Metionina (mg/d)	2,85 ± 1,28	2,78 ± 1,13	NS	0,99 (0,67-1,50)
Serina (mg/d)	5,15 ± 2,20	5,14 ± 1,95	NS	0,89 (0,59-1,30)
Álcool (g/d)	25,17 ± 39,8	19,14 ± 43,42	NS	1,08 (0,73-1,61)

1 - As diferenças em nutrientes foram determinadas utilizando o teste Mann-Whitney ajustado para idade, sexo e história familiar de cancro colo rectal. OR, odds ratio.

2 - Os OR foram determinados utilizando valores acima e abaixo do valor da mediana de consumo. Os *cut-offs* utilizados foram: vitamina B6, 2,7mg; vitamina B12, 12,5µg; folato, 406,7µg; metionina, 2,58mg; serina, 4,86mg; glicina, 4,68mg; e álcool: 3,4g/d.

3 - média ± desvio padrão (para todos os valores).

### Genótipos dos Polimorfismos

As frequências dos genótipos dos polimorfismos encontram-se descritas na Tabela 2. Nos controlos, as distribuições dos genótipos encontravam-se em equilíbrio Hardy Weinberg com excepção para o polimorfismo MTHFR C677T. Nos controlos, as frequências das variantes alélicas dos genótipos MTHFR C677T, MTR A2756G, e SHMT C1420T foram respectivamente 31,2%, 16,7%, e 26,5%, e nos casos 32,7%, 15,1% e 28,6%, respectivamente. O polimorfismo MTR A2756G per si não foi associado a um aumento do risco de CCR (Tabela 2). Pelo contrário, indivíduos homozigóticos para a variante MTHFR 677 (TT) apresentaram um risco 3 vezes superior de CCR (OR: 3,01; IC 95%: 1,3-6,7). Da mesma forma, a homozigotia para o polimorfismo SHMT C1420T revelou um risco 2,6 vezes superior de desenvolver CCR (IC 95%: 1,1-5,9). Nenhuma das variantes alélicas dos três polimorfismos foi associada ao risco de CCR. Analisando apenas o grupo de doentes, não verificámos nenhuma correlação entre o genótipo e sexo, localização do tumor (cólon ou recto), estadio da doença, ou história familiar de CCR. Também avalíamos a interacção dos 3 polimorfismos na modulação do risco de CCR. Para cada género não se observou haver interacção com os genótipos (dados não apresentados).

**Tabela 2** – Frequências genótípicas e associação com o risco de CCR

	<b>Casos</b> <b>(n=196)</b> <b>% (n)</b>	<b>Controlos</b> <b>(n=200)</b> <b>% (n)</b>	<b>P<sup>1</sup></b>	<b>OR (IC 95%)<sup>2</sup></b>
<i>MTHFR</i>				
CC/CT	86,7 (170)	95,5 (191)	0,002	1
TT	13,3 (26)	4,5 (9)		3,01 (1,3-6,7)
Alelo C	67,3 (264)	68,8 (275)	NS	1
Alelo T	32,7 (128)	31,2 (125)		1,07 (0,79-1,44)
<i>MTR</i>				
AA/AG	98,0 (192)	98,0 (196)	NS	1
GG	2,0 (4)	20,0 (4)		0,77 (0,18-3,3)
Alelo A	84,8 (333)	84,9 (339)	NS	1
Alelo G	15,1 (59)	16,7 (67)		0,90 (0,61-1,32)
<i>SHMT</i>				
CC/CT	90,0 (177)	95,5 (191)	0,04	1
TT	10,0 (19)	4,5 (9)		2,6 (1,1-5,9)
Alelo C	71,4 (280)	73,5 (294)	NS	1
Alelo T	28,6 (112)	26,5 (106)		1,11 (0,81-1,52)

1 - Calculados com teste de qui-quadrado.

2 - O genótipo wild type/heterozigótico foi a categoria de referência para o cálculo do OR (regressão múltipla). OR foi ajustado para idade, sexo, e história de cancro colo rectal.

### **Interacção entre dieta e polimorfismos**

A interacção entre a ingestão de vários nutrientes dadores de grupos metilo e álcool, e do polimorfismo MTHFR C677T é apresentada na Tabela 3. Curiosamente, observámos que um consumo reduzido de todos os nutrientes dadores de grupos metilo estava associado a um aumento do risco de desenvolver CCR nos indivíduos TT, mas apenas foi observada uma interacção significativa para o folato (OR: 14,0; IC 95%: 1,8-108,5). A ingestão de álcool não mostrou nenhum efeito na modulação do risco. Relativamente aos polimorfismos MTR A2756G e SHMT C1420T não foram observadas interacções significativas com nenhum dos nutrientes estudados.

**Tabela 3 – Odds Ratio (OR)** para o risco de CCR de acordo com o polimorfismo C677T MTHFR e a dieta<sup>1</sup>

	MTHFR C677T		p para a interacção
	CC/CT	TT	
Vitamina B6			
Baixo	0,83 (0,55-1,26) <sup>2</sup>	1,77 (0,67-4,68)	NS
Elevado	1	7,22 (1,6-32,6)	
Vitamina B12			
Baixo	1,01 (0,67-1,53)	2,71 (0,9-8,0)	NS
Elevado	1	3,95 (1,2-12,4)	
Folato			
Baixo	0,77 (0,51-1,17)	1,50 (0,59-3,8)	0,05
Elevado	1	14,0 (1,8-108,5)	
Glicina			
Baixo	1,1 (0,7-1,6)	2,0 (0,7-5,3)	NS
Elevado	1	8,2 (1,8-36,9)	
Metionina			
Baixo	1,1 (0,75-1,76)	2,1 (0,8-6,2)	NS
Elevado	1	5,9 (1,6-1,3)	
Serina			
Baixo	0,92 (0,6-1,4)	1,79 (0,63-5,14)	NS
Elevado	1	5,7 (1,6-20,4)	
Álcool			
Baixo	1,1 (0,72-1,6)	3,5 (1,1-11,3)	NS
Elevado	1	3,2 (1,1-9,5)	

1 – O genótipo combinado *wild type/heterozigotico* (CC/CT) e baixo consumo foi a categoria de referência para o cálculo dos OR (regressão múltipla). Os OR foram ajustados para idade, sexo, história de cancro colo rectal e determinado utilizando os valores acima ou abaixo do valor mediano de consumo. Os *cut-offs* foram: vitamina B6, 2,7 mg; vitamina B12, 12,5µg; folato, 406,7µg; metionina, 2,58mg; serina, 4,86mg; glicina: 4,68mg e álcool: 3,4g/d.

2 - OR; IC 95% dentro de parêntesis (para todos os valores).

## DISCUSSÃO

O presente estudo caso-controlo avaliou, numa população Portuguesa, o risco de CCR e a interacção entre a ingestão de folato e de outros nutrientes relacionados com o metabolismo do grupo metil, e polimorfismos genéticos de enzimas do ciclo do metabolismo do folato. Vários estudos epidemiológicos, clínicos, e em animais realizados nas últimas 2 décadas sustentam a ideia de que baixos níveis de folato predis põem à carcinogénese colo-rectal (12). Os mecanismos biológicos associados à depleção de folato e carcinogénese colo-rectal incluem a alteração na síntese de nucleótidos, na metilação do DNA, ou em ambos, já que o folato é o intermediário principal para a maioria das reacções de metilação no metabolismo celular (2, 12-15).

Apesar da maioria dos estudos se focarem apenas no folato, existem outros nutrientes, como vitamina B6 ou a vitamina B12, que são importantes co-enzimas necessárias à actividade de diferentes enzimas envolvidas nestes ciclos de metilação, como a MTR ou SHMT, ou certos aminoácidos essenciais e não essenciais que desempenham igualmente importantes funções no ciclo da metilação do DNA. Por estas razões, no presente estudo avaliámos a influência destes nutrientes relacionados com o metabolismo do grupo metilo de forma isolada e também em interacção com as enzimas do ciclo da metabolização do folato, MTHFR, MTR, e SHMT, no risco de CCR.

Os nossos dados revelam que, excepto para o folato, nenhum dos outros nutrientes que analisámos de forma isolada ou conjuntamente, influenciou o risco de CCR. Para o folato, observámos que uma ingestão superior a 406,7 µg/dia reduzia o risco de CCR em mais de 30% (OR: 0,67; IC 95%: 0,45-0,99). Estes resultados estão de acordo com a maioria dos estudos epidemiológicos prospectivos publicados (16,17), apesar de recentemente ter sido levantada a hipótese de um consumo elevado de folato, nos indivíduos possuidores de lesões pré-malignas, adenomas colo-rectais por exemplo, poder na realidade aumentar o risco de CCR (7,18). Contudo, gostaríamos de destacar que este aumento no risco de CCR é observado quando são utilizadas doses farmacológicas de ácido fólico (a forma sintética de folato, com melhor biodisponibilidade) e não com a ingestão de apenas folato proveniente da dieta. No que respeita à influência que os polimorfismos exercem no risco de CCR, o polimorfismo C677T do gene da MTHFR é provavelmente o mais estudado, mas a sua relação com o CCR mantém-se incerta. A presença desta variante polimórfica (TT) revelou reduzir *in vitro* a actividade da enzima a 30% (19), o que pode resultar numa redução significativa da metilação do DNA nos indivíduos TT em comparação com os indivíduos CC e CT (20).

Contrariamente à maioria dos estudos previamente publicados que revelam uma redução de 50% no risco de CCR nos indivíduos detentores do genótipo TT, nós observámos que o genótipo TT estava associado a um aumento no risco CCR (OR: 3,01; IC 95%: 1,3-6,7). No entanto, uma análise crítica aos estudos anteriormente publicados sugere que o efeito protector do genótipo TT parece estar fortemente dependente do consumo de folato. Assim, nos primeiros estudos realizados nos países da América do Norte, Chen *et al* (21) verificaram que o genótipo TT poderia mesmo aumentar o risco de CCR em homens com um elevado consumo de álcool (OR: 1,56; IC 95%: 0,65-3,81). O álcool é um conhecido antagonista do metabolismo do folato, e de forma semelhante à depleção de folato, foi demonstrado que um abuso crónico de álcool resulta numa hipometilação do DNA (22). Num estudo posterior, Ma *et al* (23), revelaram que o genótipo TT conferia um efeito protector no risco de CCR, mas apenas nos indivíduos com um consumo elevado de folato. Nos homens com consumo reduzido de folato, o genótipo TT estava na verdade associado a um aumento do risco de desenvolver CCR (OR: 1,33; IC 95%: 0,34-5,17). Destaca-se que todos os estudos desde então realizados na América do Norte (que inequivocamente revelam um efeito protector do genótipo TT) foram efectuados depois da política legislativa de fortificação dos cereais com ácido fólico. Finalmente, é preciso ter em conta que até 35-50% dos adultos americanos consomem regularmente suplementos vitamínicos, a

maioria dos quais fornecem 400 µg de ácido fólico por comprimido. Todas as considerações acima mencionadas, são possíveis explicações para o facto de todos os estudos realizados nos EUA desde 1998-2000, que examinam o efeito do polimorfismo MTHFR C677T, observarem um efeito protector do genótipo TT, porque a ingestão de folato era elevada na grande maioria, se não mesmo em todos os indivíduos (23,24). No estudo publicado por Le Marchand *et al* (25) os autores observaram um consumo total de folato entre 500 e 600 µg/dia, enquanto no presente estudo observámos um consumo perto dos 400µg/dia. Esta diferença de consumo, poderá ser uma explicação plausível, para a divergência de resultados obtidos em estudos oriundos da Europa (26-28), México (29), ou mesmo da Austrália (30), onde o genótipo TT foi na realidade associado a um risco aumentado de CCR. A fortificação não foi implementada nem na Europa nem na Austrália; é por isso muito provável que os níveis de folato sejam substancialmente mais baixos do que em países onde a fortificação já foi implementada. A sustentar esta hipótese, quando analisámos a interacção entre a ingestão de folato e o polimorfismo da MTHFR, observámos que um consumo reduzido de folato era especialmente deletério nos indivíduos TT (OR: 14,0; IC 95%: 1,8-108,5). A razão para não termos observado um efeito protector do folato nos indivíduos TT, deve-se provavelmente ao facto de na nossa população o consumo de folato não alcançar os níveis necessários, para transformar o genótipo TT num factor protector.

No presente estudo avaliámos igualmente o efeito do recentemente descrito polimorfismo na MTR, o A2756G (31). Tal como nós, Ma *et al* (5) e Marchand *et al* (25) observaram que o polimorfismo do MTR não estava associado ao risco de CCR, nem se verificou interacção significativa com nenhum dos nutrientes dadores de grupos metilo analisados.

Finalmente, também estudámos o polimorfismo SHMT1 C1420T. Que seja do nosso conhecimento, existe apenas um estudo até à data que examinou a relação entre o genótipo do SHMT1 e o risco de CCR, não tendo sido observada qualquer interacção (7). Recentemente, Van den Donk *et al* (32) estudaram a relação entre este polimorfismo, dieta e adenomas colorectais e concluíram que o polimorfismo SHMT1 C1420T não desempenhava qualquer papel na carcinogénese colo rectal. Uma das hipóteses para esta falta de interacção, segundo Chen *et al* (8), é que a SHMT2 (outra isoforma da mesma enzima) poderá também fornecer o grupo carbono necessário para o metabolismo do folato. Nos nossos dados observámos que este polimorfismo estava associado a um aumento no risco de desenvolver CCR, no entanto o significado das nossas observações é limitada dado o reduzido número de indivíduos homozigóticos para a variante (n = 9). Uma vez que o significado funcional deste polimorfismo não é ainda conhecido, e devido ao número reduzido de indivíduos homozigóticos, estes resultados necessitam de confirmação.

Em conclusão, o presente estudo demonstra que o polimorfismo MTHFR C677T modifica o risco de desenvolver CCR dependendo dos níveis de folato consumidos. Que seja do nosso conhecimento, a influência deste polimorfismo genético nunca foi examinado nos países da Europa do Sul, onde o consumo de folato, e outros nutrientes dadores de grupos metilo, bem como o de álcool é certamente diferente dos países do Norte da Europa ou da América. Uma vez que a política de fortificação de ácido fólico nunca foi implementada no nosso País, e o consumo

de suplementos vitamínicos não é frequente, é expectável que a nossa população apresente níveis relativamente baixos de ingestão folato. Esta é uma explicação plausível para o facto, de na nossa população, o genótipo TT estar associado a um risco aumentado de desenvolver CCR, particularmente nos indivíduos com baixa ingestão de folato (Tabela 3).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, e cols. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(12):1611-21.
2. Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002;132(8S): 2412S-2418S.
3. Kune G, Watson L. Colorectal Cancer Protective Effects and the Dietary Micronutrients Folate, Methionine, Vitamins B6, B12, C, E, Selenium, and Lycopene. *Nutrition and Cancer* 2006;56(1):11-21.
4. Crott J, Mason J. MTHFR polymorphisms and colorectal neoplasia. MTHFR polymorphisms and disease. Eds: Per Magne Ueland and Rima Rozen. Landes Bioscience, 2004.
5. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, e col. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(9):825-9.
6. Ulvik A, Vollset SE, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C -> T and methionine synthase 2756A -> G polymorphisms: a study of 2,168 case-control pairs from the JANUS Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(12):2175-80.
7. Luebeck EG, Moolgavkar SH, Liu AY, et al. Does folic acid supplementation prevent or promote colorectal cancer? Results from model-based predictions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(6): 1360-7.
8. Chen J, Kyte C, Valcin M, et al. Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. *Int J Cancer*. 2004; 110(4): 617-20.
9. Guerreiro CS, Cravo ML, Brito M, Vidal PM, Fidalgo PO, Leitão CN. The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons. *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1592-7.
10. Lopes CM. Reprodutibilidade e validação do questionário semi quantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e Enfarte agudo do miocárdio: Estudo de caso-controlo de base comunitária*. PhD thesis. Porto 2000; 78-115.
11. Arroll B, Jackson R, Beaglehole. Validation of a three-month physical activity recall questionnaire with a seven-day food intake and physical activity diary. *Epidemiology* 1991;2(4):296-99.
12. Kim YI. Folate and carcinogenesis: Evidence, mechanisms and implications. *J Nut Biochem* 1999;10(2):66-85.



13. Fenech, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001;475(1-2):57-67.
14. Ames, BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001;475:7-20.
15. Duthie, SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999;55(3):578-92.
16. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine, low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(4):265-73.
17. Su LJ, Arab L. Nutritional status of folate and colon cancer risk: evidence from NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol* 2001;11(1):65-72.
18. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G, Rosenberg IH. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(7):1325-9.
19. Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, e col. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genetics* 1995; 10(1):111-3
20. Friso S, Choi S, Girelli D, e col. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8):5606-11.
21. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56(21):4862-64.
22. Cravo, L. Glória, ME Camilo, M. Resende et al. DNA methylation and subclinical vitamin deficiency of folate, pyridoxal-phosphate and vitamin B12 in chronic alcoholics. *Clinical Nutrition* 1997;16:29-33.
23. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, e col. Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57(6):1098-102.
24. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8(6): 513-18.

25. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifreid A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13(3):239-48.
26. Ryan BM, Molloy AM, McManus R, Arfin Q, Kelleher D, Scott JM, e col. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in colorectal cancer: role in tumour development and significance of allelic loss in tumor progression. *Int J Gastrointest Cancer* 2001;30(3):105-11.
27. Sachse C, Smith G, Wilkie M, Wilkie MJV, Barrett JH, Waxman R, e col. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2002;23(11):1839-50.
28. Plaschke J, Schwanebeck U, Pistorius S, Saeger HD, Schackert HK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of sporadic and hereditary colorectal cancer with or without microsatellite instability. *Cancer Lett* 2003;10;191(2):179-85.
29. Delgado-Enciso I, Martinez-Garza SG, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopes R, Bosques-Padilla F, Calderon-Garciduenase AL, e col. 677T mutation of MTHFR gene in adenomas and colorectal cancer in a population sample from the Northeastern Mexico. Preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex* 2001;66(1): 32-7.
30. Shannon B, Gnasampanthan S, Beilby J, Lacopetta BA. Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 2002;50(4):520-4.
31. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, e col. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 17;95(6):3059-64.
32. Van den Donk M, Visker MH, Harryvan JL, Kok FJ, Kampman E. Dietary intake of B-vitamins, polymorphisms in thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase 1, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Lett*. 2007; 250(1):146-53.

**II. ESTUDO 2 – Polimorfismos 5' e 3' UTR da Timidilato Sintetase modulam o risco de Cancro Colo-Rectal de forma independente da ingestão de dadores do grupo metilo<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> “5' and 3' UTR Thymidylate Synthase polymorphisms modulate the risk of colorectal cancer independently of the intake of methyl group donors”

Molecular Medicine Reports 2008 Sep-Oct;1(5):747-52



## **RESUMO**

A timidilato sintetase catalisa a conversão de dUMP em dTMP usando o 5,10-metilenotetrahidrofolato como dador de grupos metil, sendo esta uma etapa limitante na síntese de DNA. Estão descritos dois polimorfismos para este gene: um polimorfismo de repetição de 28pb em *tandem* na região *enhancer* do promotor a 5' (3R vs 2R) e uma deleção de 6pb na região 3' UTR. Ambos os polimorfismos podem afectar os níveis de proteína na célula. No presente estudo caso-controlo pretendemos investigar a influência destes dois polimorfismos no desenvolvimento de cancro colo-rectal (CCR), assim como a sua possível interacção com o consumo de folato, vitamina B6 e vitamina B12. Um total de 196 casos e 200 controlos, com igual distribuição de sexo e idade, foram seleccionados para este estudo. Não foi encontrada qualquer associação entre o polimorfismo 28pbrpt e o desenvolvimento de CCR, tendo sido no entanto observado que indivíduos com o genótipo 6bp/del e del/del apresentam um risco significativamente inferior de desenvolver CCR (OR=0,47; IC95%= 0,30-0,72). Um genótipo combinado (2R/2R; 6bp/del+del/del) está associado, de forma estatisticamente significativa, a uma redução superior do risco de desenvolvimento de CCR (OR=0,42; IC95%= 0,26-0,69). Não foram encontradas interacções entre os polimorfismos estudados e a ingestão nutricional de vitaminas. Estes resultados indicam, pela primeira vez, que o alelo del do polimorfismo de deleção na região 3'UTR é um factor protector para o desenvolvimento de CCR de forma independente do consumo na alimentação de dadores de grupos metil.

**Palavras-Chave:** Polimorfismos da Timidilato Sintetase; Cancro Colo-rectal; Vitamina B6; Vitamina B12; Folato; Dadores de grupos metil

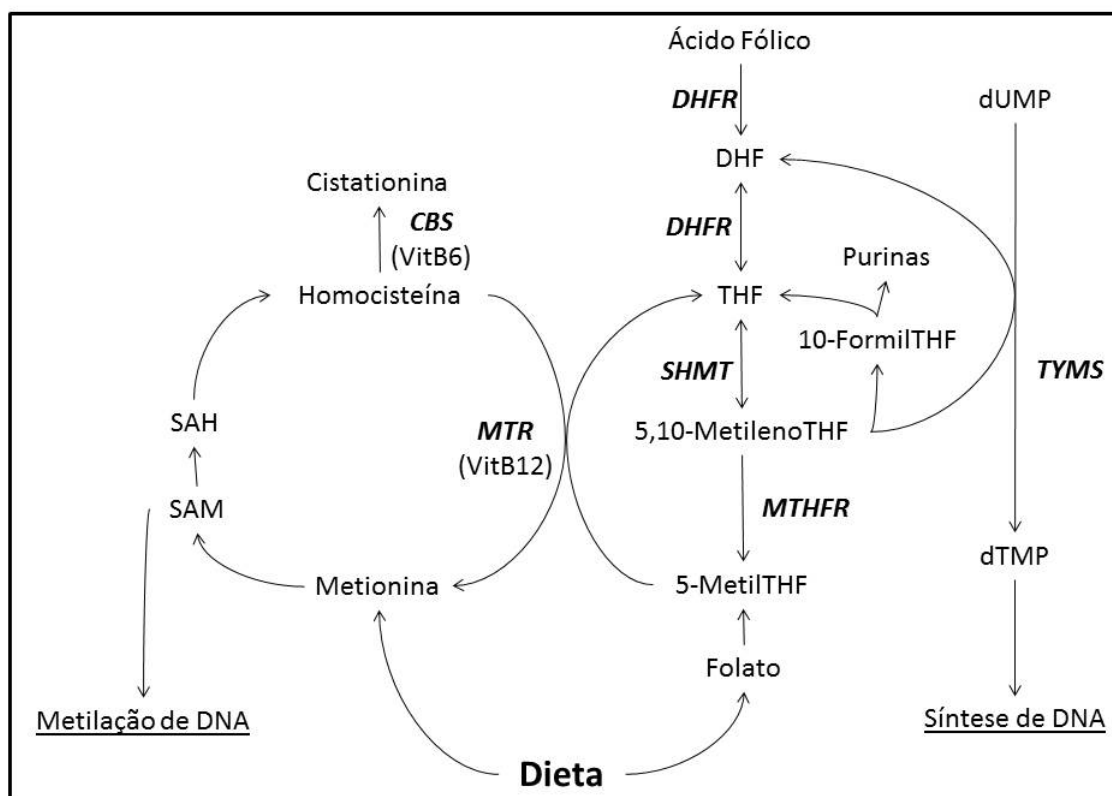
## INTRODUÇÃO

O cancro colo-rectal (CCR) é um dos tipos de cancro com maior incidência e prevalência nas sociedades desenvolvidas (1), representando 9,4% dos cancros nos indivíduos do sexo masculino e 10,1% no sexo feminino (2). Em Portugal é uma das principais causas de morte por cancro, e tem uma das maiores taxas de mortalidade na Europa (3,4).

É sabido que este tipo de tumores tem uma origem multifactorial, envolvendo quer factores genéticos quer factores ambientais (5,6). Um dos factores que tem sido associado a uma diminuição do risco de desenvolver CCR é o consumo elevado de folato (7-9). Vários estudos sugerem uma associação inversa entre o estado do folato, quer na medição da ingestão quer na medição de folato em circulação, e o risco de desenvolver este tipo de tumores (10). O possível mecanismo pelo qual uma deficiência de folato aumenta, e uma suplementação de folato diminui o risco para CCR tem sido estudado nos últimos anos (11-13), e estará relacionado com o envolvimento desta vitamina na mediação da transferência de grupos metil (Fig.1). Através desta aparentemente simples acção, o folato desempenha um papel-chave em vários processos relacionados com a integridade do DNA, tais como a síntese e metilação do DNA (11-15). Isto explica o facto de vários estudos feitos *in vitro* e *in vivo* mostrarem que uma deficiência em folato resulta em quebras de cadeia do DNA, hipometilação, deficiência nos mecanismos de reparação do DNA e aumento da mutagénese (11-15). Nalguns destes trabalhos, foi observado que a associação inversa entre os níveis de folato e o risco de CCR poderia ser modificada por polimorfismos em genes de enzimas envolvidas no metabolismo desta vitamina, nomeadamente a metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR) e a timidilato sintetase (TYMS). A primeira é uma enzima que catalisa a conversão irreversível de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), desempenhando assim um papel fundamental na metilação do DNA e na sua síntese (Fig. 1).

Vários estudos anteriores sugerem que a suplementação de folato poderá ser particularmente eficaz em indivíduos que possuam o alelo T do polimorfismo C677T MTHFR (16-19), dado que este polimorfismo causa instabilidade termolábil na enzima, reduzindo assim a sua actividade. A TYMS é a enzima responsável por catalisar a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTTP), competindo com a MTHFR pelo substrato 5,10-MTHF para esta reacção (20). Em relação à TYMS foi identificado um polimorfismo na região 5' do promotor do gene que contém 2 (2R) ou 3 repetições (3R) de uma sequência com 28pb (21). Alguns estudos indicam que os indivíduos homozigóticos para o alelo 3R têm níveis de mRNA e proteína superior aos homozigóticos para as 2R (22). Outro polimorfismo identificado neste gene é uma deleção de 6pb na região 3'UTR do gene da TYMS, sendo que alguns estudos associam esta deleção a uma diminuição dos níveis de mRNA cerca de 4 vezes em comparação com os indivíduos homozigóticos para a não deleção (23). A maioria dos estudos realizados até ao momento tem examinado o papel destes polimorfismos na resposta dos indivíduos à quimioterapia baseada em 5-fluorouracilo (5-FU), demonstrando que indivíduos com polimorfismos associados a elevada expressão do gene têm uma pior resposta ao tratamento e

um pior prognóstico (24). Poucos estudos, do nosso conhecimento até ao momento, têm estudado a importância do conjunto dos polimorfismos da TYMS no risco de desenvolver CCR, e os efectuados apresentam alguma discrepância nos resultados, assim como variação entre diferentes regiões do globo (25-31).



**Figura 1 – Ciclo do folato**

As enzimas encontram-se em **negrito** e *itálico*. CBS (*cistationina-β-sintase*), DHFR (*dihidrofolato reductase*), MTR (*metionina sintetase*), MTHFR (*metilenotetrahidrofolato reductase*), SHMT (*serina hidroximetiltransferase*), TS (*timidilato sintetase*), 5,10-metilenotHF (5,10 metilenotetrahidrofolato), 5-metilTHF (5-metiltetrahidrofolato), 10-formilTHF (10-formiltetrahidrofolato), DHF (*dihidrofolato*), dTMP (*deoxithimidina monofosfato*), dUMP (*deoxiuridina monofosfato*), SAH (*S-Adenosilhomocisteína*), SAM (*S-adenosilmetionina*), THF (*tetrahidrofolato*), VitB6 (*vitamina B6*), VitB12 (*vitamina B12*)

O objectivo deste estudo caso-controlo foi o de examinar a possível influência dos polimorfismos da TYMS no desenvolvimento de CCR numa população portuguesa, assim como investigar uma possível interacção entre os polimorfismos e a ingestão de nutrientes da via do folato, tais como folato e as vitaminas B6 e B12.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Populações em estudo***

Este estudo caso-controlo foi realizado com indivíduos provenientes do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil de Lisboa (IPOFGL), tendo sido aprovado pelo Comité Científico e de Ética do mesmo Instituto. Todos os sujeitos participantes no estudo deram o seu consentimento informado por escrito.

Para esta investigação foram seleccionados 196 pacientes com diagnóstico histológico de CCR (104 do sexo masculino, 92 do sexo feminino; média de idades  $64,2 \pm 11,3$  anos) e 200 dadores de sangue saudáveis com uma distribuição de sexo e idade similar à dos pacientes (106 indivíduos do sexo masculino, 94 do sexo feminino; média de idades  $62,2 \pm 12,1$ ) e sem historial de qualquer tipo de cancro. Dos pacientes, 169/196 (86,5%) tinham sido recentemente diagnosticados com CCR, enquanto os restantes se encontravam em tratamento de recidivas. Em termos terapêuticos 119/196 (60,7%) não haviam recebido qualquer tipo de tratamento, 28/196 (14,3%) haviam sido sujeitos a cirurgia, 13/196 (6,6%) haviam realizado radioterapia pélvica, 11/196 (5,6%) tinham sido sujeitos a um ou mais ciclos de quimioterapia e os restantes 25/196 (12,8%) estavam sujeitos a uma forma combinada de tratamento. A distribuição por estadio TNM foi a seguinte: estadio I 24/178 (13,5%); estadio II 64/178 (35,9%); estadio III 53/178 (29,8%) e estadio IV 37/178 (20,8%). Todos os indivíduos do nosso estudo eram caucasianos.

### ***Avaliação nutricional***

Para a quantificação da ingestão de folato, vitamina B6 e vitamina B12 foi utilizado um questionário de frequência alimentar, validado para a população portuguesa (32). Os participantes foram convidados a recordar seus hábitos alimentares no ano anterior ao diagnóstico CRC, no caso dos pacientes, ou no ano anterior à entrevista no caso dos controlos. Foi analisado o tipo e quantidade de ingestão de alimentos, num banco de dados modificado para incluir alguns itens de comida portuguesa, através do software *Food Processor*, versão 7 (Esha Research, Inc, Salem, EUA, 2000), permitindo a quantificação dos diferentes macro e micronutrientes. Calcularam-se valores nutricionais de alimentos e suplementos (11 / 196 pacientes e nenhum dos controlos tomavam suplementos).

### ***Genotipagem dos polimorfismos***

O DNA foi extraído de sangue periférico obtido por punção digital usando *Generation Capture Card Kit* (Gentra Systems). Os diferentes fragmentos para análise foram amplificados utilizando primers específicos para cada determinação alélica (5'-CCTGGCGCACGCTCTCTA-3' e 5'-GATCTGCCCCAGGTAAGTGC-3' para o polimorfismo 28pb; 5'-TTTACAAGCTATTCCCTCAAA-



3' e 5'-CAGAATGAACAAAGCGTGGGA-3' para o polimorfismo 6pb). Ambos os fragmentos dos polimorfismos foram amplificados utilizando 1,5 U de Taq polimerase (Fermentas, Ontário, Canadá), com uma concentração de primers de 200 nM e concentração de  $Mg^{2+}$  de 2,5 mM. O fragmento do polimorfismo 28pbprt foi amplificado na presença de 2x *Enhancer* (Invitrogen, CA, EUA). As etapas de amplificação foram as seguintes: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto. Foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

O genótipo do polimorfismo *TYMS* 28bp foi determinado pela separação dos fragmentos em gel de agarose 2%. Para o genótipo do polimorfismo *TYMS* 6bpdel foi efectuada a análise por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) usando 10U da enzima de restrição *DraI* (New England Biolabs, MA, EUA) incubada a 37°C durante 2 horas, seguido de uma separação dos fragmentos em gel de agarose a 4%.

### Análise estatística

Para a determinação do risco realizou-se uma análise de *odds ratio* usando uma regressão logística binária, ajustada para sexo, idade e história familiar. A interacção entre polimorfismos e ingestão de nutrientes foi avaliada através do teste de *likelihood ratio*. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS, versão 15.0.

## RESULTADOS

Do total de 196 casos e 200 indivíduos controlo incluídos neste estudo, 173 casos e 170 controlos foram usados na análise do polimorfismo de repetição 28bp e 185 casos e 193 controlos usados na análise do polimorfismo de deleção 6bp, dado não ter sido possível amplificar por PCR algumas das amostras de DNA recolhidas.

**Tabela 1 – Média da ingestão diária dos nutrientes nas duas populações**

Nutrientes	Casos	Controlos	<i>Odds ratio</i> <sup>1</sup> OR (95% CI)		
	Média da Ingestão (µg/dia)	Média da Ingestão (µg/dia)	Baixo	Alto	P
Vitamina B6	2.83±1.06	2.85±0.98	1	0.71 (0.52-1.07)	0.10
Vitamina B12	14.53±9.05	14.36±8.22	1	0.89 (0.59-1.34)	0.58
Folato	401.57±161.88	433.40±161.32	1	0.67 (0.45-1.02)	0.06

1 – *Odds Ratio* da interacção entre a ingestão de nutrientes e a susceptibilidade de CCR. A ingestão de nutrientes foi dividida em dois grupos de *baixo* e *alto*, que significa um consumo menor do que a mediana calculada e maior do que a mediana, respectivamente (B6 - mediana de ingestão na população controlo: 2,82 µg/dia; B12 - mediana de ingestão na população controlo: 12.63 µg/dia; Folato - mediana de ingestão na população controlo: 422.22 µg/dia).

A ingestão média diária de folato, vitaminas B6 e B12 para ambos pacientes e controlos encontra-se descrita na Tabela 1. Para testar se a ingestão destes nutrientes pode influenciar o risco de desenvolver o CCR, pacientes e controlos foram divididos em dois grupos, de acordo com se a ingestão foi maior ou menor do que a mediana calculada para a população controlo, seguido do cálculo de *odds ratio* (Tabela 1). Descobrimos que uma ingestão diária de ácido fólico acima de  $422.2 \pm 161.3 \mu\text{g}$  se encontra associada a uma diminuição de 33% do risco de desenvolvimento de CRC (OR = 0,67; 95% CI = 0.45-1,02). Não houve diferenças estatisticamente significativas para a ingestão de vitamina B6 ou B12.

**Tabela 2** – Frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos da TYMs nas duas populações

	Casos	Controlos	P <sup>1</sup>
	N (%)	N (%)	
Repetição 28pb			
2R/2R	24 (13.9%)	30 (17.6%)	0.330
2R/3R	102 (59.0%)	87 (51.2%)	
3R/3R	47(27.1%)	53 (31.2%)	
2R	150 (0.434)	147 (0.432)	1.000
3R	196 (0.566)	193 (0.568)	
Deleção 6pb			
6bp/6bp	99 (53.5%)	72 (37.3%)	0.006
6bp/del	69 (37.3%)	100 (51.8%)	
del/del	17 (9.2%)	21 (10.9%)	
6bp	267 (0.722)	244 (0.632)	<<0.010
del	103 (0.278)	142 (0.368)	

1 – Teste de  $\chi^2$  entre as duas populações para a distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos

As distribuições genotípicas e alélicas do polimorfismo de repetição 28pb e do polimorfismo de deleção 6pb, para ambos os casos e controlos, são apresentadas na Tabela 2. Uma vez que no polimorfismo de repetição 28pb encontrámos um único indivíduo com 4 repetições e dado que não são bem conhecidas as consequências funcionais deste alelo, este sujeito foi excluído da análise. Quanto à distribuição genotípica, casos e controlos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois polimorfismos. Não se observaram diferenças significativas entre casos e controlos para o polimorfismo de repetição 28pb ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, houve uma diferença estatisticamente significativa entre casos e controlos para o polimorfismo de deleção 6bp ( $P < 0,010$ ), com maior frequência do alelo del nos controlos em comparação com os casos. Este resultado reforça a hipótese de que a presença do alelo del, em heterozigotia ou homozigotia, representa um efeito protector. Conforme descrito na tabela 3 observámos que os genótipos 6pb/del e del/del se encontram associados a uma redução do risco de CCR (OR = 0,47, IC 95% = 0,30-0.72). O polimorfismo de repetição 28pb não evidenciou nenhuma associação significativa com o risco de CCR (OR = 1,33, IC 95% = 0,74-2.39).

**Tabela 3** – Análise de *odds ratio* para os polimorfismos da *TYMS*

Polimorfismo	OR <sup>1</sup> (IC 95%)		P
	2R/2R	2R/3R+3R/3R	
Repetição 28bp	1	1.29 (0.71-2.36)	0.41
	6bp/6bp	6bp/del+del/del	
Deleção 6bp	1	0.47 (0.30-0.72)	0.001

1 – O cálculo de *odds ratio* foi realizado usando uma regressão logística binária, ajustada para o sexo, idade e história familiar

Também testámos a hipótese se poderia haver um genótipo combinado deste gene, influenciando o desenvolvimento de CCR, através de uma análise de *odds ratio* que compara os indivíduos homozigotos para o alelo 2R no polimorfismo de repetição 28pb e heterozigóticos ou homozigóticos para o alelo del do polimorfismo de deleção 6pb (2R/2R, 6bp/del + 6bp/del), com o resto dos indivíduos. Observámos que os indivíduos portadores deste genótipo combinado tinham um ainda menor risco de desenvolver CCR (OR = 0,42, 95% CI = 0,29-0,73).

Ao testar se houve uma interacção entre estes polimorfismos e a ingestão das três vitaminas estudadas, não foram encontradas associações significativas para qualquer dos polimorfismos analisados (dados não apresentados). Não encontramos, também, nenhuma correlação entre qualquer um destes polimorfismos com a localização do tumor, estadio da doença, resposta a quimio ou radioterapia, ou sobrevivência (dados não apresentados).

## DISCUSSÃO

O folato, uma vitamina B solúvel em água, tem sido identificado como factor protector contra vários tipos de cancro, incluindo o cancro colo-rectal (11, 13). Estudos epidemiológicos e clínicos indicam que a ingestão de folato e os níveis de folato no sangue são inversamente correlacionados com o risco de desenvolver adenomas, bem como CCR (7-9). Estudos em animais também estabeleceram, de forma inequívoca, uma associação causal entre deficiência de folato e CCR (33). Num estudo posterior Kim *et al* (34) também mostraram que o efeito de modulação do folato na carcinogénese colo-rectal dependente tanto do tempo como da dose de intervenção do folato. Mais recentemente, alguns autores levantaram a questão se a suplementação com ácido fólico, dada a indivíduos com lesões pré-malignas poderia aumentar o risco de CCR (35, 36). O mecanismo pelo qual a ingestão de ácido fólico modula o risco de cancro provavelmente relaciona-se com o facto de o folato fornecer o grupo metil para metilação de DNA, ou para a conversão de uracilo em timina (10, 12, 37). Estudos moleculares e epidemiológicos recentes sugerem também que esse efeito protector do folato pode ser ainda modulado por interacções com polimorfismos genéticos nos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do mesmo. O polimorfismo genético mais estudado é o polimorfismo

C677T do gene *MTHFR*. Este polimorfismo pode influenciar o risco de CCR em interacção com os níveis de folato, ingestão de álcool, vitaminas B6 e B12 ou com a ingestão de dadores de grupo metil como metionina (13, 38).

Em relação à *TYMS*, que converte a dUMP para dTMP, um passo limitante na síntese de DNA, a maioria dos estudos analisaram o impacto de dois polimorfismos (repetição 28bp e deleção 6bp) como factores de prognóstico ou como indicadores de resposta ao 5-FU. Poucos estudos avaliaram a influência destes polimorfismos na etiologia do CCR, obtendo resultados discrepantes. Assim, em relação aos adenomas colo-rectais, as lesões precursoras para CCR, Ulrich *et al* (23) observaram que o polimorfismo *TYMS* 28pb não é um factor de risco para o desenvolvimento de adenomas colo-rectais, mas houve uma interacção gene-nutriente estatisticamente significativa com a ingestão de folato: entre os indivíduos com genótipo 3R/3R a ingestão de folato superior a 440 µg/dia foi associada a um risco diminuído, enquanto entre os indivíduos com o 2R/2R, foi associado a um risco 1,5x superior. Neste mesmo estudo, o polimorfismo de deleção 6pb da *TYMS* não foi associado ao risco de desenvolver adenomas colo-rectais, nem houve qualquer interacção com a ingestão de ácido fólico. Em contraste, Chen *et al* (39) num estudo de caso-controlo englobado num estudo prospectivo, *Physicians' Health Study*, observaram uma interacção significativa entre o polimorfismo *TYMS* 28pbprt e consumo de álcool na modulação do risco de desenvolver adenomas colo-rectais. O efeito do polimorfismo 6bp del não foi examinado neste estudo (39).

Em relação à influência destes polimorfismos no desenvolvimento de CCR Ulrich *et al* observaram que homens com o genótipo 2R/2R tinham uma redução de 30% do risco de CCR, em comparação com aqueles com genótipo homozigótico 3R. Nenhuma associação foi encontrada para o polimorfismo 6pbdel (31). Chen *et al* (40), usando o mesmo modelo de estudo no *Physicians' Health Study*, não encontraram nenhuma associação entre o risco de CCR e o polimorfismo de deleção 6pb. Em relação ao polimorfismo de 28pbprt, os indivíduos com o alelo 2R tinham um risco menor de CCR, embora não estatisticamente significativo, quando comparados com aqueles com genótipo 3R/3R, sugerindo um efeito protector para o alelo de 2R. Além disso, nenhum dos genótipos compostos influenciou significativamente o risco de CRC, nem houve qualquer efeito de modulação por parte dos níveis de folato. Estes resultados estão apenas parcialmente de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Assim, no nosso estudo mostrou-se que a ingestão de folato por si só tinha um efeito protector no risco de desenvolver CCR (OR = 0,67, 95%CI-0.45-0.99). No que diz respeito aos polimorfismos da *TYMS*, da mesma forma que Chen *et al* (40) e Ulrich *et al* (31), também nós descobrimos que as diferenças entre as duas populações estudadas em relação ao polimorfismo de 28pbprt foram não significativas. Em contraste com os resultados obtidos por Ulrich *et al* (31), que verificou que o alelo polimórfico de 6pb da *TYMS* não se encontrava associado com um risco diminuído de CCR, no presente estudo, indivíduos homozigóticos ou heterozigóticos para a variante del tinham claramente um menor risco para o desenvolvimento de CCR. Além disso, combinando-se o efeito protector do alelo del do polimorfismo *TYMS* 6pbdel e o alelo de 2R do polimorfismo *TYMS* 28pbprt, encontrámos um genótipo combinado do gene *TYMS* (2R/2R, 6pbdel/del +

6bpdel) que se encontra associado a uma diminuição de 58% do risco de desenvolvimento de CCR.

As razões para as discrepâncias observadas entre os vários estudos não são evidentes, mas é importante notar que todos os estudos anteriores sobre a influência que estes polimorfismos genéticos podem ter no risco de desenvolver adenomas colo-rectais ou CCR, foram realizados na América do Norte onde a dieta é certamente muito diferente da ingestão alimentar média em Portugal, podendo assim influenciar os resultados obtidos. Podemos também especular que interacções com outros polimorfismos genéticos poderiam explicar estes resultados diferentes, embora nós não tenhamos encontrado uma diferença estatisticamente significativa entre a nossa distribuição genotípica e as dos outros estudos (31, 40), excepto na distribuição genotípica para o alelo de repetição 28pb na nossa população com CCR e a população com CCR no estudo de Ulrich *et al* ( $p < 0,05$ ) (dados não apresentados) (31). Num estudo anterior, que usou a mesma população deste estudo, analisámos polimorfismos em genes de enzimas do metabolismo do folato envolvidas no ciclo de metilação de DNA incluindo o polimorfismo C677T da metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR). Nenhuma interacção foi observada entre os dois polimorfismos da TYMS analisados no presente estudo e o polimorfismo C677T da MTHFR na modulação do risco de CRC (resultados não publicados).

Os resultados obtidos no presente e anteriores estudos (31, 40) sugerem que os alelos que resultam numa baixa expressão de gene apresentam um efeito protector contra o desenvolvimento do CCR. Como ambos os polimorfismos contribuem para a concentração final intracelular da proteína TYMS, investigámos o papel da combinação de dois genótipos (2R/2R + 6bp/del, del/del) no desenvolvimento do CRC. Dado que o alelo 2R está associado um nível inferior de tradução do mRNA *TYMS*, e que o alelo del está associado com a instabilidade do mRNA de *TYMS*, os indivíduos com este genótipo combinado devem ter um nível mais baixo de proteína TYMS. Descobrimos que indivíduos com este genótipo combinado têm uma redução de 2,4 vezes no risco de desenvolvimento de CCR. Podemos então colocar a hipótese de que um baixo nível da proteína TYMS leva a uma redução do risco de desenvolvimento de CCR. Isto pode ser devido ao facto de a TYMS e MTHFR competirem para o mesmo substrato (5,10-metilenotHF). Níveis elevados de TYMS poderiam levar a um esgotamento do *pool* de 5,10-metilenotHF, o que poderia prejudicar a conversão de homocisteína em metionina (Figura 1), que é o precursor imediato de S-adenosilmetionina, o dador universal de grupos metilo para várias moléculas incluindo DNA. Assim, pelo menos teoricamente, uma alta actividade de TYMS poderia prejudicar a metilação de DNA, que tem sido amplamente reconhecida como um importante mecanismo epigenético de controlo de transcrição dos genes. Esta hipótese precisa de confirmação e está sendo testada actualmente.

Em conclusão e do nosso conhecimento actual, este é o primeiro estudo realizado num país do Sul da Europa que mostra um efeito protector para o alelo del do polimorfismo *TYMS* 6pbdel por si e também a partir de um genótipo combinado incluindo este alelo, e o alelo 2R do polimorfismo *TYMS* 28pbprpt. Estes efeitos protectores não parecem ser mediados pelo consumo de folato ou pela ingestão de outros dadores de grupos metil.

Embora sejam necessários mais estudos para compreender a razão de os mesmos polimorfismos desempenharem papéis diferentes em diferentes populações, os nossos resultados contribuem para lançar alguma luz na compreensão destas complexas interações entre genes e nutrientes na modulação do risco de desenvolver CCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilmink ABM. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Diseases of the Colon & Rectum*. 1997;V40(4):483-93.
2. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*. 2000 September 30, 2000;321(7264):805-8.
3. Bingham S, Riboli E. DIET AND CANCER - THE EUROPEAN PROSPECTIVE INVESTIGATION INTO CANCER AND NUTRITION. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(3):206-15.
4. Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in Portugal. *European Journal of Cancer*. 2003;39(17):2507-20.
5. Campos FG WA, Kiss DR, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J. Diet and colorectal cancer: current evidence for aetiology and prevention. *Nutricion Hospitalaria*. 2005;XX(1):18-25.
6. Willett W. The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature*. 1989;338(6214):389-94.
7. Sanjoaquin MA AP, Thorogood M, Mann J, Key TJ. Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *British Journal of Cancer*. 2004;90:118-21.
8. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, Vegetables, Dietary Fiber, and Risk of Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001 April 4, 2001;93(7):525-33.
9. Thun MJ, Calle EE, Namboodiri MM, Flanders WD, Coates RJ, Byers T, et al. Risk Factors for Fatal Colon Cancer in a Large Prospective Study. *J Natl Cancer Inst*. 1992 October 7, 1992;84(19):1491-500.
10. Zhang SM, Moore SC, Lin J, Cook NR, Manson JE, Lee IM, et al. Folate, Vitamin B6, Multivitamin Supplements, and Colorectal Cancer Risk in Women. *Am J Epidemiol*. 2006 January 15, 2006;163(2):108-15.
11. Choi S-W, Mason JB. Folate Status: Effects on Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *J Nutr*. 2002 August 1, 2002;132(8):2413S-8.
12. Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;475(1-2):57-67.
13. Kim Y-I. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1999 02;10(2):66-88.
14. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;475(1-2):7-20.

15. Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull.* 1999 January 1, 1999;55(3):578-92.
16. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism and the Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 1996 November 1, 1996;56(21):4862-4.
17. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Dietary Interactions, and Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 1997 March 15, 1997;57(6):1098-102.
18. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate Reductase, Diet, and Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 June 1, 1999;8(6):513-8.
19. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, et al. Colorectal Adenomas and the C677T MTHFR Polymorphism: Evidence for Gene-Environment Interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 August 1, 1999;8(8):659-68.
20. Sharp L, Little J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2004 March 1, 2004;159(5):423-43.
21. Takeishi K, Kaneda S, Ayusawa D, Shimizu K, Gotoh O, Seno T. Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. *Nucl Acids Res.* 1985 March 25, 1985;13(6):2035-43.
22. Pullarkat ST SJ, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2001;1((1)):65-70.
23. Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, Fosdick L, Potter JD. Thymidylate Synthase Promoter Polymorphism, Interaction with Folate Intake, and Risk of Colorectal Adenomas. *Cancer Res.* 2002 June 1, 2002;62(12):3361-4.
24. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal Tumors Responding to 5-Fluorouracil Have Low Gene Expression Levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, and Thymidine Phosphorylase. *Clin Cancer Res.* 2000 April 1, 2000;6(4):1322-7.
25. Curtin K. UCM, Samowitz W., Bigler J., Caan B., Potter JD., Slattery ML. Thymidylate synthase polymorphisms and colon cancer: Associations with tumor stage, tumor characteristics and survival. *International Journal of Cancer.* 2007;120(10):2226-32.
26. Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, Navarro M, Vilardell F, Guino E, et al. Tumor Thymidylate Synthase 1494del6 Genotype As a Prognostic Factor in Colorectal Cancer Patients Receiving Fluorouracil-Based Adjuvant Treatment. *J Clin Oncol.* 2006 April 1, 2006;24(10):1603-11.



27. Hitre E. EB, Barna; Adleff, Vilmos; Czegledi, Ferenc; Horvath, Zsolt; Gyergyay, Fruzsina; Lovey, Jozsef; Kovacs, Tibor; Orosz, Zsolt; Lang, Istvan; Kasler, Miklos; Kralovanszky, Judit. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenetics & Genomics*. 2005;15((10)):723-30.
28. Marsh S MH. Thymidylate synthase pharmacogenetics in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2001;1((3)):175-8.
29. Marsh S MJ, Cassidy J, McLeod HL. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2001;19((2)):383-6.
30. Tsuji T, Hidaka S, Sawai T, Nakagoe T, Yano H, Haseba M, et al. Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region Is Not an Efficacious Marker for Tumor Sensitivity to 5-Fluorouracil-based Oral Adjuvant Chemotherapy in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 September 1, 2003;9(10):3700-4.
31. Ulrich CM, Curtin K, Potter JD, Bigler J, Caan B, Slattery ML. Polymorphisms in the Reduced Folate Carrier, Thymidylate Synthase, or Methionine Synthase and Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 November 1, 2005;14(11):2509-16.
32. Lopes C. Nutrition and acute myocardial infarction: Community case control study. PhD Thesis College of Medicine from Porto University Portugal 2000:78-115.
33. Cravo ML, Mason JB, Dayal Y, Hutchinson M, Smith D, Selhub J, et al. Folate Deficiency Enhances the Development of Colonic Neoplasia in Dimethylhydrazine-treated Rats. 1992. p. 5002-6.
34. Kim YI, Salomon RN, Graeme-Cook F, Choi SW, Smith DE, Dallal GE, et al. Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose responsive manner in rats. 1996. p. 732-40.
35. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G, et al. A Temporal Association between Folic Acid Fortification and an Increase in Colorectal Cancer Rates May Be Illuminating Important Biological Principles: A Hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 July 1, 2007;16(7):1325-9.
36. Ulrich CM, Potter JD. Folate and Cancer--Timing Is Everything. *JAMA*. 2007 June 6, 2007;297(21):2408-9.
37. Otani T, Iwasaki M, Hanaoka T, Kobayashi M, Ishihara J, Natsukawa S, et al. Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, and Vitamin B2 Intake, Genetic Polymorphisms of Related Enzymes, and Risk of Colorectal Cancer in a Hospital-Based Case-Control Study in Japan. *Nutrition and Cancer*. 2005;53(1):42-50.
38. Kim YI. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev*. 2000;58((7)):205-9.

39. Chen J, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, Fuchs CS, Giovannucci E. Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region and Risk of Colorectal Adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 December 1, 2004;13(12):2247-50.
40. Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, et al. Polymorphism in the Thymidylate Synthase Promoter Enhancer Region Modifies the Risk and Survival of Colorectal Cancer. 2003. p. 958-62.

### **III. ESTUDO 3 – Timidilato Sintetase e Metionina Sintetase encontram-se sobre-expressas em Cancro do Cólon e Recto<sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup> *“Thymidylate Synthase and Methionine Synthase are overexpressed in colorectal cancer”*



## RESUMO

Os genes do ciclo do folato têm sido associados com o desenvolvimento de cancro colo-rectal (CCR). A sua expressão não foi no entanto ainda estudada de forma global.

Neste estudo tivemos como objectivo avaliar a expressão dos genes da metionina sintetase (MTR), metilenotetrahydrofolato reductase (MTHFR), serina hidroximetiltransferase (SHMT1) e da timidilato sintetase (TYMS) em amostras de CCR. Foram ainda determinados os seus polimorfismos e os níveis de metilação de DNA nas amostras de CCR.

Avaliámos a expressão relativa das amostras tumorais por RT-PCR em Tempo Real em 31 amostras de CCR. Os genótipos para cinco diferentes polimorfismos (deleção de 6pb *TYMS*, repetição de 28pb *TYMS*, *MTR* A2756G, *MTHFR* C677T, *SHMT1* C1420T) foram analisados por PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan ou por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os níveis de metilação do DNA foram determinados da cromatografia de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

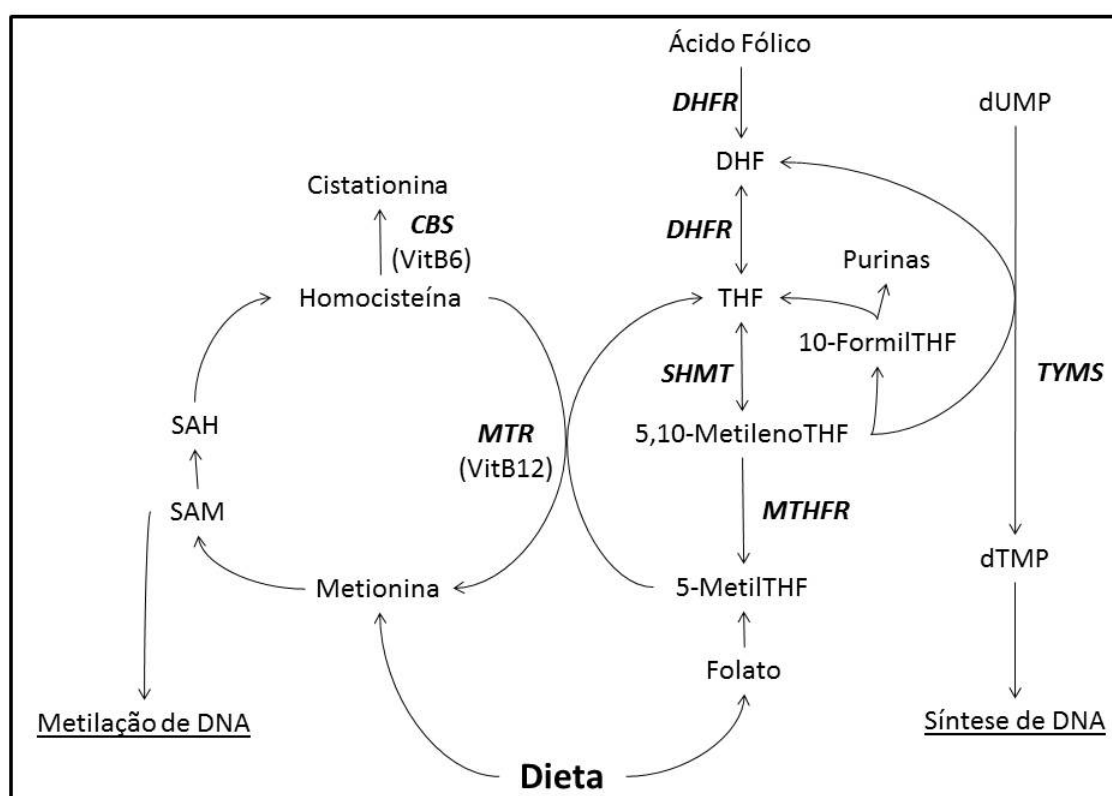
Descobrimos que os genes da MTR e TYMS apresentaram um nível significativamente mais elevado de expressão em amostras de tumores quando comparadas com amostras da mucosa normal ( $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a expressão dos genes MTHFR e SHMT1 embora este último apresentasse uma tendência de maior expressão. Foram identificados dois transcritos alternativos da TYMS com uma maior expressão em células tumorais. Verificámos que a expressão do gene da TYMS é significativamente maior no genótipo 6bp/6bp quando comparado com o 6bp/del + del/del genótipos no polimorfismo de deleção 6pb *TYMS*. A expressão do gene *SHMT1* está correlacionada com o polimorfismo C1420T, estando o genótipo CC associado a uma menor expressão.

A regulação da expressão de genes do ciclo do folato em células cancerígenas favorece a produção de timidilato para a rápida divisão celular, elevando-se a expressão dos genes da TYMS e MTR. Esta é a primeira vez que alta expressão do gene da MTR é associada com o desenvolvimento de CCR, reforçando o seu papel como um possível alvo terapêutico.

**Palavras-chave:** Cancro colo-rectal; metionina sintetase; metilenotetrahydrofolato reductase; serina hidroximetiltransferase; timidilato sintase; expressão; ciclo do folato

## INTRODUÇÃO

O cancro colo-rectal (CCR) é hoje um dos cancros mais prevalentes nas sociedades desenvolvidas (1), representando 9,4% dos cancros nos homens e 10,1% nas mulheres (2). O CCR é uma doença complexa que envolve múltiplos factores genéticos e nutricionais (3). Entre os últimos, folato tem mostrado desempenhar um papel importante na carcinogénese colo-rectal, provavelmente, por causa de seu envolvimento nos processos de metilação e síntese de DNA (4) (Figura 1).



**Figura 1 – Ciclo do folato.**

As enzimas encontram-se em **negrito** e *itálico*. CBS (cistationina-β-sintase), DHFR (dihidrofolato reductase), MTR (metionina sintetase), MTHFR (metilenotetrahidrofolato reductase), SHMT (serina hidroximetiltransferase), TS (timidilato sintetase), 5,10-metilenotHF (5,10 metilenotetrahidrofolato), 5-metilTHF (5-metiltetrahidrofolato), 10-formilTHF (10-formiltetrahidrofolato), DHF (dihidrofólio), dTMP (deoxitimidina monofosfato), dUMP (deoxiuridina monofosfato), SAH (S-Adenosilhomocisteína), SAM (S-adenosilmetionina), THF (tetrahidrofolato), VitB6 (vitamina B6), VitB12 (vitamina B12)

Poucos estudos foram feitos sobre a expressão dos genes do ciclo de folato em amostras tumorais provenientes de biópsias de pacientes com CCR. Os estudos realizados até ao momento incidiram essencialmente no estudo da expressão da timidilato sintase (TYMS) e da metilenotetrahidrofolato reductase (MTHFR) (5-8). A TYMS catalisa a conversão de dUMP em dTMP usando 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) como dador de grupos metil (9). A MTHFR é uma enzima fundamental para o metabolismo do folato catalisando a conversão irreversível de 5,10-MTHF em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), desempenhando assim um papel importante na metilação e síntese de DNA (10). Alta expressão de TYMS foi encontrada em células de CCR, estando associada a uma pior resposta à quimioterapia e uma taxa de

sobrevivência mais baixa (6-8, 11-13). Um único estudo detectou uma baixa expressão de MTHFR em células de CCR (5). Do nosso conhecimento actual, não foram realizados até ao momento estudos que envolvam a expressão dos genes da metionina sintetase (MTR) e da serina hidroximetiltransferase citosólica (SHMT1). A SHMT1 é uma enzima que converte o tetraidrofolato (THF) em 5,10-MTHF (14). A MTR converte homocisteína em metionina, pela transferência de um grupo metil do 5-MTHF, produzindo assim a molécula que dará origem à S-adenosilmetionina (SAM) essencial para a metilação do DNA nas células (Fig1). Embora o ciclo do folato seja considerado fundamental para o ciclo celular funcionar de forma correcta, não foi feito nenhum estudo abrangente da expressão dos vários genes em amostras de CCR. Portanto, este estudo teve como objectivo avaliar, pela primeira vez, a expressão dos genes *MTR*, *MTHFR*, *TYMS* e *SHMT1* em amostras de CCR em associação com os seus polimorfismos e com a metilação do DNA.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Pacientes e Biópsias***

Analísámos amostras de tecido provenientes de tumores colo-rectais e das mucosas normais adjacentes, recolhidos por biópsias de 31 pacientes com diagnóstico histológico de CCR, após ter sido obtido um consentimento informado. As amostras recolhidas foram armazenadas em RNA Later (Ambion, Austin, Texas, EUA) a - 80°C imediatamente após a cirurgia até que a extracção de RNA foi executada.

### ***Extracção de Ácidos Nucleicos e Síntese de cDNA***

O DNA foi extraído de amostras de tecido usando DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante.

O RNA foi extraído usando SV Total RNA Isolation System (Promega, Mannheim, Alemanha), conforme recomendado pelo fabricante.

O cDNA foi sintetizado usando Multiscribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), através hexâmeros aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante num volume total de 50 µl.

### ***Genotipagem de Polimorfismos***

O polimorfismo C677T do gene *MTHFR* e o polimorfismo A2756G *MTR* foram genotipados através da discriminação alélica com sondas TaqMan "Assays by Design" (Applied Biosystems,

Foster City, Califórnia, EUA). O polimorfismo C1420T do gene *SHMT1* foi genotipado com o uso de sondas TaqMan desenhadas com o software BEACON DESIGNER 5.0 (Premier Biosoft, Palo Alto, Califórnia, EUA). Primers e sondas utilizadas são apresentados na Tabela 1. Realizaram-se as reações para a análise em Tempo Real usando misturas de 4µL de DNA genómico, 10 µl de iQ™ Supermix (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), 1µL de 20 X Assay mix e ddH<sub>2</sub>O até perfazer um volume final de 20µL. O programa de amplificação foi o seguinte: desnaturação a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, emparelhamento e extensão a 60°C durante 1min. Todas as reações foram realizadas no iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). Para os polimorfismos de repetição de 28pb e deleção de 6pb no gene *TYMS* a amplificação do DNA por PCR foi realizada utilizando um conjunto específico de primers para cada determinação do genótipo (Tabela 1).

**Tabela 1** – Primers e sondas para a genotipagem e expressão

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Sonda
Deleção 6pb TYMS	TTTCACAAGCTATTCCCTCAAA	CAGAATGAACAAAGCGTGGA	
Repetição 28pb TYMS	CCTGGCGCACGCTCTCTA	GATCTGCCCCAGGTACTGC	
SHMT1 C1420T	GAAAGAGTTCAAGGAGAGACT	CTCCTTTAGAAGTCAGGCAG	CAGAGGGAAGAG/AAGAGGCGAAGC
Expressão TYMS	TGGAATCCAAGAGATCTTCCTCTG	GCGATGTTGAAAGGCACACC	CGCTGCCTCCATGCCATGCCCTC
Expressão TYMS d23	GCCTGAGAGATTATTCAGGACA	TTCTTCTGTCGTCAGGGTTG	TCACTCTTTCAGTTGGTCAACTCCC
Expressão TYMS d4	TGGAATCAGATCTTCCTCTG	GCATCTCCCAAAGTGTGTAT	CCATGCCCTCTGCCAGTTCT
Expressão SHMT1	GCGGACATGGCTCACATCAG	TCACCACATGGCAGTGTTCAA	CACCACGCCAGCCGCCACCAG
Expressão MTHFR	CCAAACCGGAATGGTCACAAAG	GGCTGTGAGTTGATGGTGAGG	TTGCCTGCCCTGGAACGATGAGCC
Expressão MTR	GCAAGGAGGAGACTCGACAAC	GCAGAATGGCATTGATCTCATCC	CGCTCCAAGACCTGTCGCAACCCG

Ambos os fragmentos para análise dos polimorfismos foram amplificados utilizando 1,5 U de Taq polimerase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), com uma concentração de primers de 200 nM e Mg<sup>2+</sup> com concentração de 2,5 mM. Os fragmentos do polimorfismo 28bp rpt foram amplificados na presença de solução Enhancer 2x concentrada (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). As etapas de amplificação foram como se segue: 95°C durante 10



minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto. Uma etapa final de extensão foi efectuada a 72°C durante 10 minutos. O genótipo do polimorfismo de repetição de 28pb da TYMS foi determinado pela separação do gel de agarose 2% dos fragmentos. Para o genótipo de deleção de 6pb usámos a análise por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) usando 10 U de DraI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA) para a digestão, a 37°C durante 2 horas, seguida de uma separação em gel de agarose a 4% dos fragmentos.

### **Expressão Génica**

A expressão dos genes em amostras de tumor e no tecido adjacente normal foi obtida usando PCR em Tempo Real quantitativo com base na metodologia de fluorescência das sondas TaqMan. Para tal foram desenhados primers e sondas específicos para cada gene, estando as sondas marcadas com o fluoróforo FAM (Tabela 1). Para evitar a detecção de DNA genómico as sondas foram localizadas nos limites do exão-exão dos genes. O rRNA 18S Humano foi usado como um gene de controlo endógeno. Realizaram-se as reacções para a análise em Tempo Real usando misturas de 2µL do cDNA, 10 µL de iQ™ Supermix (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), primers a 500nM, sondas a 300nM, 1µL de Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e ddH<sub>2</sub>O até o volume final de 20µL. A amplificação foi realizada como se segue: desnaturação a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15s, emparelhamento e extensão a 60°C durante 1min. Todas as reacções foram realizadas no iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). A expressão relativa dos genes das amostras tumorais em função das amostras de tecido normal adjacente foi determinada utilizando o método de ddCt (15).

### **Quantificação de 5-metilcitosina**

A quantificação de nucleótidos foi realizada através da digestão do DNA, seguida de separação e quantificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A hidrólise da 10µg de DNA foi feita usando 600mU de Nuclease Microcócica (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) e 10mU Fosfodiesterase II (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) num tampão com 250 mM HEPES e 100 mM CaCl<sub>2</sub> a 37°C durante 3 horas. Após a digestão as amostras foram defosforiladas usando 260mU de Fosfatase Alcalina (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) a 37°C durante 1 hora. Posteriormente as amostras foram injectadas numa coluna cromatográfica Aquasil C18 200x4 5µm. A fase móvel da cromatografia foi: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,03 M, pH 2,4; Acetonitrilo; H<sub>2</sub>O = 19:2:19 (v/v/v), com um fluxo de 1 ml/min num Surveyor System (Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts, EUA). A quantificação foi obtida através de curvas de

calibração para as áreas dos picos detectados nos cromatogramas usando nucleótidos puros (citosina e 5-metilcitosina).

### Análise Estatística

A análise bivariada foi realizada com recurso ao teste t-Student ou teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas e o teste de qui-quadrado para variáveis categóricas. O nível de significância estatística foi estabelecido para  $P < 0,05$ . Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS versão 17.0

## RESULTADOS

As frequências genotípicas e alélicas foram determinadas para os cinco polimorfismos estudados e são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes *MTR*, *MTHFR*, *SHMT1* e *TYMS*

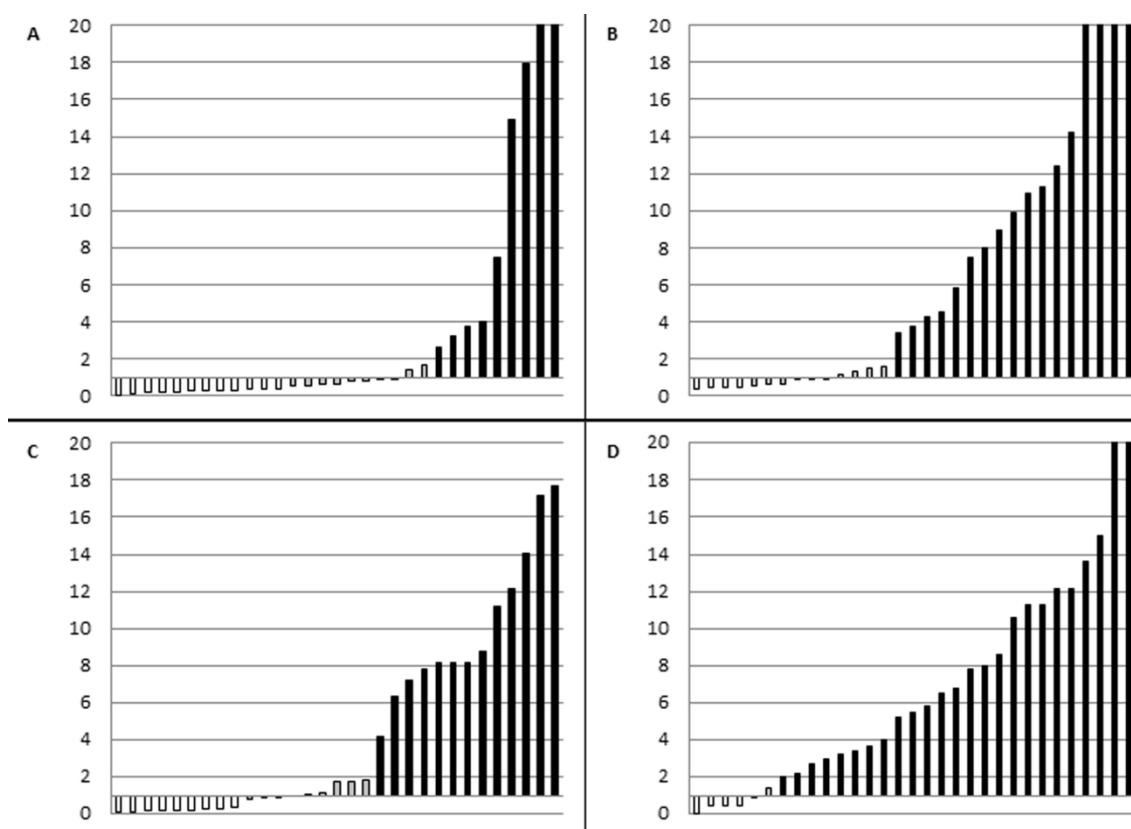
Polimorfismo	Frequência Genotípica % (n)	Frequência alélica
<i>MTR</i> A2756G		
AA	71% (22)	
AG	25.8% (8)	
GG	3.2% (1)	
A		0.84
G		0.16
<i>MTHFR</i> C677T		
CC	35.5% (11)	
CT	51.6% (16)	
TT	12.9% (4)	
C		0.61
T		0.39
<i>SHMT1</i> C1420T		
CC	48.4% (15)	
CT	41.9% (13)	
TT	9.7% (3)	
C		0.69
T		0.31
<i>TYMS</i> 6bp deletion		
6bp/6bp	35.5% (11)	
6bp/del	41.9% (13)	
del/del	22.6% (7)	
6bp		0.56
del		0.44
<i>TYMS</i> 28bp repeat		
2R/2R	29.0% (9)	
2R/3R	42.0% (13)	
3R/3R	29.0% (9)	
2R		0.5
3R		0.5

Para todos os polimorfismos a distribuição genotípica encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi calculada a expressão relativa de cada gene nas amostras tumorais, tendo sido classificadas como sub-expressão, expressão normal ou sobre-expressão, conforme tinham expressão relativa abaixo 0.5, entre 0,5 e 2 ou acima de 2 respectivamente (Tabela 3) (Figura 2).

**Tabela 3 – Expressão relativa nas amostras tumorais**

Gene	Expressão Tumoral Relativa <sup>1</sup>		
	Sub-Expressão	Normal	Sobre-Expressão
<i>MTR</i>	12.9%	32.3%	54.8%
<i>MTHFR</i>	38.7%	32.3%	29%
<i>SHMT1</i>	29%	29%	42%
<i>TYMS</i>	12.9%	6.5%	80.6%

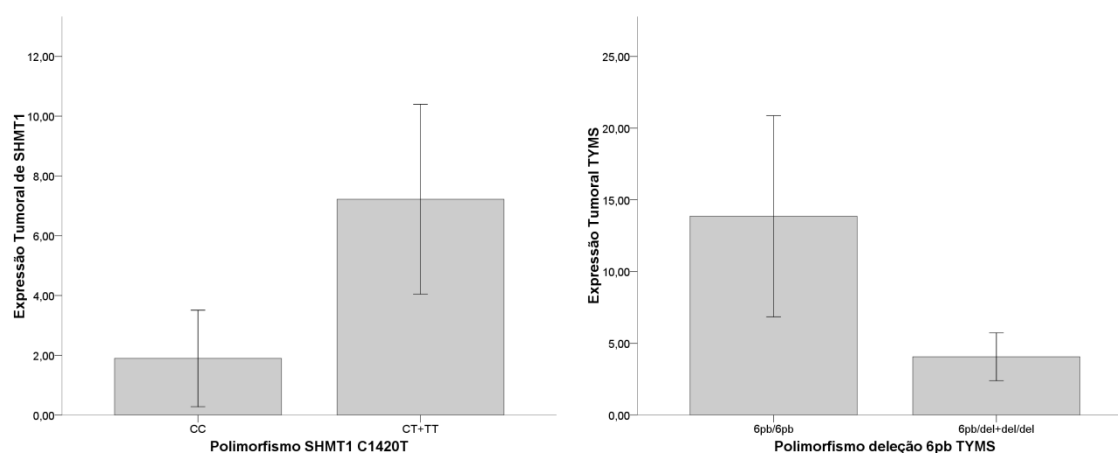
1- Sub-expressão: expressão relativa inferior a 0,5; Normal: expressão relativa entre 0,5 e 2; Sobre-expressão: expressão relativa superior a 2.



**Figura 2 – Expressão tumoral relativa por amostra.** A – Expressão relativa de *MTHFR*; B – Expressão relativa de *MTR*; C – Expressão relativa de *SHMT1*; D – Expressão relativa de *TYMS*. Sub-expressão: barras brancas; Expressão normal: barras cinzentas; Sobre-expressão: barras pretas.

Observou-se uma expressão superior em amostras de tumor, quando comparado com amostras de mucosa normal, para os genes *MTR* e *TYMS* ( $P < 0,05$ ). Aproximadamente 55% das amostras de tumor apresentavam sobre-expressão do gene *MTR*, enquanto para o gene *TYMS* foi identificada sobre-expressão em 80% das amostras de tumor. Também encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão do gene da *MTR* e o gene da *TYMS* já que 64% das amostras que se encontravam sobre-expressas para o gene da *TYMS* também

se encontravam sobre-expressas para o gene da *MTR* ( $p < 0,05$ ). Para os genes da *SHMT1* e da *MTHFR* não foram encontradas diferenças estatisticamente significativamente entre a expressão nas amostras tumorais e nas amostras da mucosa normal, embora o gene *SHMT1* se tenha identificado uma ligeira tendência para sobre-expressão (Tabela 3). Identificámos, também, a expressão de duas isoformas alternativas do gene *TYMS*, *TYMS $\Delta$ 23* que não contem os exões 2 e 3 e *TYMS $\Delta$ 4* que não contem o exão 4. *TYMS $\Delta$ 23* só foi encontrada em amostras tumorais, sendo expressas em cerca de 26% das amostras. *TYMS $\Delta$ 4* encontra-se expressa em tecidos normais e tumorais, sendo encontrados em 48% das amostras de mucosa normal e em 58% das amostras de tumor. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão de *TYMS $\Delta$ 4* entre as amostras normais e tumorais. Em seguida, foram analisados possíveis correlações entre polimorfismos e os níveis de expressão dos genes nas amostras tumorais. Foi encontrada uma correlação entre o nível de expressão de *TYMS* e o polimorfismo de deleção 6pb. O genótipo 6pb/6pb apresenta um maior nível de expressão quando comparado com o 6bp/del e del/del ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão de *TYMS* em tumores e o polimorfismo de repetição de 28pb. Também encontrámos uma associação entre a expressão de *SHMT1* e o polimorfismo C1420T. O genótipo CC tem um menor nível de expressão quando comparado com os restantes genótipos ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Nenhuma correlação foi encontrada para a expressão dos genes *MTR* e *MTHFR* e os seus polimorfismos.



**Figura 3** – Média da expressão tumoral relativa dos genes *SHMT1* e *TYMS*, de acordo com os respectivos polimorfismos. As barras representam o IC 95%.

Quando determinamos a percentagem de citosinas metiladas no DNA das amostras dos tecidos normais e tumorais encontrámos, como esperado, uma hipometilação em amostras de tumor (4,45% em amostras normais, 3% em amostras de tumor;  $p < 0,05$ ). Esta hipometilação não se encontrava contudo correlacionada com os níveis de expressão ou polimorfismos de nenhum dos genes estudados.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho estudámos a expressão genética em amostras de tumores colo-rectais de quatro genes do metabolismo do folato em associação com os seus polimorfismos e os níveis de 5-metilcitosina no DNA. A maioria dos estudos realizados anteriormente centrou-se principalmente na expressão dos genes da *TYMS* e da *MTHFR* no CCR (5-7, 11, 16). Do nosso conhecimento actual, não foi feito nenhum trabalho que estudasse a expressão de *MTR* e *SHMT1* em carcinomas do cólon e recto. Assim, o nosso estudo é o primeiro olhar para a expressão destes quatro genes simultaneamente no CCR.

Encontrámos uma sobre-expressão estatisticamente significativa para os genes *TYMS* e *MTR* em amostras de tumor quando comparadas com amostras de mucosa normal adjacente. Alguns estudos têm demonstrado que a expressão mais elevada do gene da *TYMS* em amostras de tumor está associada com uma pior resposta à quimioterapia e uma taxa de sobrevivência inferior (7, 8, 12, 13). Esta expressão superior pode ser explicada pela maior necessidade de nucleótidos por células tumorais por causa das elevadas taxas de replicação devido à acelerada divisão celular (17). Dado que a actividade da *TYMS* é a única maneira sintetizar timidilato *de novo*, espera-se que células de divisão rápida precisem de ter níveis mais elevados de *TYMS*. A sobre-expressão do gene da *MTR* é descrita pela primeira vez, do nosso conhecimento, em amostras de tumores do CCR. O papel principal da *MTR* é converter a homocisteína para metionina, transferindo um grupo metil do 5-MTHF, fornecendo o substrato para a metilação de DNA nas células (18, 19). Como se sabe, as células tumorais apresentam um baixo nível de metilação do DNA (20). Assim espera-se que estas células não precisem de níveis elevados de metionina para a metilação e portanto poderiam ter uma menor expressão de *MTR*. Podemos então colocar a hipótese de que, nas células cancerígenas, a expressão de *MTR* é maior para evitar a "armadilha do metilfolato". A *MTR* recicla 5-MTHF, resultante da actividade da *MTHFR* e da ingestão de folato através da dieta. O produto desta reacção é o THF que será convertido em 5,10-MTHF pela enzima *SHMT1* (21). O 5,10-MTHF é o substrato para a actividade da *TYMS*, por isso é essencial para a produção de timidilato (9). Uma baixa expressão de *MTR* resultaria na acumulação de 5-MTHF e, consequentemente, uma menor quantidade de THF disponível, originando a "armadilha do metilfolato" (21). Isso resultaria num nível baixo de substrato para *TYMS* levando a uma menor produção de timidilato, impedindo as células cancerígenas de se dividirem. Assim as células cancerígenas necessitariam de manter os níveis da enzima *MTR* de forma a manterem a produção de THF necessário para a produção de timidilato e consequentemente para a divisão celular. Com a correlação, referida anteriormente, entre a expressão de *TYMS* e *MTR* na mesma amostra ( $p < 0.05$ ) esta hipótese é reforçada. Zhang *et al* mostraram anteriormente que, num painel de células cancerígenas, os tempos de duplicação estão correlacionados com os níveis de expressão da *MTR* (22). Desta forma, nós somos os primeiros a mostrar que as células de amostras de CCR precisam ter alta expressão de *TYMS*

para a divisão celular rápida, mas também alta expressão de MTR para, indirectamente, fornecerem o substrato para a actividade de TYMS.

A expressão das isoformas de splicing alternativo também é um resultado interessante. Descobrimos que das isoformas encontradas *TYMSΔ23* expressa apenas em amostras de tumor e a *TYMSΔ4* expressa em amostras de mucosa normal e de tumor, embora com uma expressão mais elevada em tumor. Estas isoformas, identificadas por Hisatomi *et al* (23), mantêm a ORF de transcrição normal e têm todos os elementos necessários para produzir uma proteína, embora essas proteínas nunca tenham sido identificadas. No entanto estes transcritos podem desempenhar um papel importante na célula, mesmo que eles não sejam traduzidos. A TYMS possui um mecanismo de auto-regulação, inibindo a tradução do seu próprio mRNA ligando-se à região 5' proximal (24, 25). As isoformas mantêm as regiões que permitem a ligação da enzima ao mRNA. Desta forma, a sua sobre-expressão em células cancerígenas, poderá promover a tradução do transcrito normal, uma vez que a enzima TYMS poderá estar a ligar-se a estes mRNA em vez de inibir a tradução do mRNA completo. Esta hipótese precisa de mais testes mas ela mostra que estas isoformas alternativas podem desempenhar um papel importante na regulação da expressão da TYMS.

Os genes *MTHFR* e *SHMT1* não apresentaram uma alteração significativa da sua expressão em células de tumorais, embora o gene *SHMT1* tenha evidenciado uma tendência de aumento da expressão nestas células. Estes resultados mostram também a regulação do ciclo do folato, de forma a favorecer a actividade da TYMS em células cancerígenas. A tendência para maior expressão de *SHMT1* pode ser explicada pelo facto de a sua actividade ser essencial para fornecer o substrato da TYMS. Assim uma maior actividade de TYMS necessitará de mais substrato e portanto de uma maior expressão de *SHMT1*. Quanto à expressão de *MTHFR*, esta permaneceu inalterada em amostras tumorais quando comparadas com a mucosa normal adjacente. Este resultado suporta a nossa hipótese tendo em consideração que *MTHFR* e *TYMS* competem para o mesmo substrato (5,10-MTHF). Níveis inalterados de *MTHFR* sugerem que células tumorais favorecem a utilização do 5,10-MTHF para a actividade da TYMS, e não para a actividade da *MTHFR*. Níveis baixos de expressão da *MTHFR* têm sido anteriormente associados com piores prognósticos clínicos de pacientes com CCR (5).

Quando avaliámos possíveis associações entre os níveis de expressão e os polimorfismos dos genes encontrámos duas associações significativas: o polimorfismo de deleção de 6pb *TYMS* com a expressão de *TYMS* e o polimorfismo *SHMT1* C1420T com a expressão de *SHMT1*. No polimorfismo de deleção 6pb *TYMS*, descobrimos que indivíduos com o genótipo 6bp/6bp apresentam um maior nível de expressão do mRNA do gene quando comparado com indivíduos com outros genótipos. Este resultado encontra-se de acordo com os resultados obtidos por outros estudos que sugerem que o alelo del está associado uma instabilidade do mRNA (26). Não encontrámos nenhuma associação entre o polimorfismo de repetição de 28pb *TYMS* e o nível de expressão de *TYMS*. No caso do polimorfismo *SHMT1* C1420T, descobrimos que o genótipo CC se encontra associado com um menor nível de expressão de *SHMT1* quando comparado com os outros genótipos. Este resultado é um pouco mais difícil de explicar, uma vez

que não há nenhuma evidência sobre o papel do polimorfismo C1420T na enzima. No seu conjunto, estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos pelo nosso grupo em estudos anteriores onde se verificou que o alelo del do polimorfismo 6bpdel *TYMS* (27) e o alelo de C do polimorfismo C1420T *SHMT1* (28) (aqueles associados aqui com menor expressão) apresentaram um risco menor de desenvolver CCR. Isto vem ao encontro da hipótese referida anteriormente, as células cancerígenas necessitam ter níveis de expressão elevados de *TYMS* e *SHMT1* para manterem a sua capacidade de divisão.

No estudo dos níveis de metilação encontrámos, como esperado, um nível inferior de 5-metilcitosina nas amostras tumorais. No entanto não encontrámos nenhuma associação significativa com qualquer um dos níveis de expressão dos genes. Tal poderá estar relacionado com o facto de que a hipometilação das células cancerígenas ser um evento precoce na carcinogénese (29, 30), tornando-se difícil associá-lo com níveis de expressão de genes em células cancerígenas que se encontram em estadios mais tardios.

Em resumo, este trabalho mostra que as células cancerígenas parecem controlar a expressão dos genes do ciclo do folato de forma a favorecer a produção de timidilato, pela sobre-expressão dos genes *TYMS*, *MTR* e *SHMT1*. Esta regulação da expressão estará relacionada com a necessidade de nucleótidos por parte das células cancerígenas para permitir a sua rápida divisão. Concluímos, também, que o polimorfismo de deleção de 6bp *TYMS* e o polimorfismo C1420T *SHMT1* estão associados com diferentes níveis de expressão dos seus genes, apoiando as conclusões anteriores do nosso grupo, sugerindo seu papel como factores de risco para o desenvolvimento de CCR (27, 28).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilmink AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 1997;40(4):483-93. Epub 1997/04/01.
2. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*. 2000;321(7264):805-8. Epub 2000/09/29.
3. Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2002;11(12):1611-21. Epub 2002/12/24.
4. Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *The Journal of nutrition*. 2002;132(8 Suppl):2413S-8S. Epub 2002/08/07.
5. Odin E, Wettergren Y, Carlsson G, Danenberg PV, Termini A, Willen R, et al. Expression and clinical significance of methylenetetrahydrofolate reductase in patients with colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2006;5(5):344-9. Epub 2006/03/04.
6. Bendardaf R, Lamlum H, Elzagheid A, Ristamaki R, Pyrhonen S. Thymidylate synthase expression levels: a prognostic and predictive role in advanced colorectal cancer. *Oncology reports*. 2005;14(3):657-62. Epub 2005/08/04.
7. Chen Y, Yi C, Liu L, Li B, Wang Y, Wang X. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *The International journal of biological markers*. 2012;27(3):e203-11. Epub 2012/09/28.
8. Inoue T, Hibi K, Nakayama G, Komatsu Y, Fukuoka T, Kodera Y, et al. Expression level of thymidylate synthase is a good predictor of chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology*. 2005;40(2):143-7. Epub 2005/03/17.
9. Climie S, Santi DV. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(2):633-7. Epub 1990/01/01.
10. Chen G, Zhang C, Zhang X, Zhu Y, Tang J, Meng Z, et al. Cloning and expression of 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. *Science in China Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences*. 1998;41(6):636-43. Epub 2008/08/30.
11. Lindebjerg J, Nielsen JN, Hoeffding LD, Bisgaard C, Brandslund I, Jakobsen A. Expression of thymidylate synthase in primary colorectal adenocarcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2006;14(1):37-41. Epub 2006/03/17.



12. Nakagawa T, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Nishioka M, Yoshikawa K, et al. Thymidylate synthase (TS) protein expression as a prognostic factor in advanced colorectal cancer: a comparison with TS mRNA expression. *Hepato-gastroenterology*. 2012;59(116):1059-62. Epub 2012/05/15.
13. Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(3):529-36. Epub 2004/01/31.
14. Herbig K, Chiang EP, Lee LR, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(41):38381-9. Epub 2002/08/06.
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16.
16. Merkelbach-Bruse S, Hans V, Mathiak M, Sanguedolce R, Alessandro R, Ruschoff J, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase gene, the expression of thymidylate synthase mRNA and the microsatellite instability phenotype of colorectal cancer. *Oncology reports*. 2004;11(4):839-43. Epub 2004/03/11.
17. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24. Epub 2009/04/11.
18. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(6):3628-34. Epub 1997/02/07.
19. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human molecular genetics*. 1996;5(12):1851-8. Epub 1996/12/01.
20. De Smet C, Lorient A. DNA hypomethylation and activation of germline-specific genes in cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;754:149-66. Epub 2012/09/08.
21. Smulders YM, Smith DE, Kok RM, Teerlink T, Swinkels DW, Stehouwer CD, et al. Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. *British journal of haematology*. 2006;132(5):623-9. Epub 2006/02/01.
22. Zhang W, Braun A, Bauman Z, Olteanu H, Madzalan P, Banerjee R. Expression profiling of homocysteine junction enzymes in the NCI60 panel of human cancer cell lines. *Cancer research*. 2005;65(4):1554-60. Epub 2005/03/01.

23. Hisatomi H, Tanemura H, Iizuka T, Katsumata K, Nagao K, Sumida H, et al. Differential alternative splicing expressions of thymidylate synthase isoforms. *Cancer letters*. 2003;193(2):127-31. Epub 2003/04/23.
24. Chu E, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase as an RNA binding protein. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1996;18(3):191-8. Epub 1996/03/01.
25. Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(20):8977-81. Epub 1991/10/15.
26. Pullmann R, Jr., Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Ladner RD, Gorospe M. Differential stability of thymidylate synthase 3'-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(33):23456-63. Epub 2006/06/22.
27. Carmona B, Guerreiro C, Cravo M, Nobre-Leitao C, Brito M. 5' and 3' UTR thymidylate synthase polymorphisms modulate the risk of colorectal cancer independently of the intake of methyl group donors. *Molecular medicine reports*. 2008;1(5):747-52. Epub 2008/09/01.
28. Guerreiro CS, Carmona B, Goncalves S, Carolino E, Fidalgo P, Brito M, et al. Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(5):1413-8. Epub 2008/11/11.
29. Feo F, Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Mironi MR, Calvisi D. Genetic alterations in liver carcinogenesis: implications for new preventive and therapeutic strategies. *Critical reviews in oncogenesis*. 2000;11(1):19-62. Epub 2000/05/05.
30. Jackson K, Yu MC, Arakawa K, Fiala E, Youn B, Fiegl H, et al. DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer biology & therapy*. 2004;3(12):1225-31. Epub 2004/11/13.

**IV. ESTUDO 4 – Polimorfismo A2756G MTR como factor de susceptibilidade para o desenvolvimento de Doença de Crohn**



## RESUMO

**Introdução:** A Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória do tracto intestinal com origem multifactorial e que afecta milhões de pessoas em todo o mundo.

**Objectivo:** Neste estudo avaliámos a associação do polimorfismo A2756G do gene da metionina sintetase (MTR) com o desenvolvimento de DC, assim como a sua interacção com diferentes nutrientes na evolução da doença.

**Metodologia:** Foi estudada uma população de pacientes com DC (n=82) e uma população controlo (n=116). Em ambas as populações foi realizado uma avaliação da ingestão de nutrientes por questionário de frequência alimentar, assim como foi realizada a determinação do genótipo para o polimorfismo A2756G *MTR* por PCR em Tempo-Real com sondas TaqMan.

**Resultados:** Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa no consumo de folato entre as duas populações estudadas ( $P<0,05$ ), não se tendo verificado alterações no consumo de álcool e de vitamina B12. Foi identificado o baixo consumo de folato como factor de risco para a existência de manifestações extra-intestinais nos pacientes com DC ( $P<0,05$ ). Quanto aos polimorfismos foi possível verificar que os indivíduos com o genótipo AG e os com o genótipo GG apresentavam uma maior susceptibilidade para desenvolver DC (OR=5,1; IC 95%=2,2-12,0 e OR=16,5; IC 95%=2,3-120,7 respectivamente) quando comparados com os indivíduos AA. Verificou-se ainda uma associação inversa entre a presença do alelo G e a idade de diagnóstico dos pacientes ( $P<0,05$ ). Estes indivíduos apresentam ainda uma menor susceptibilidade para desenvolver DC na região perianal (OR=0,26; IC 95%=0,08-0,9;  $P<0,05$ ). Não foi encontrada qualquer interacção entre a ingestão dos nutrientes estudados e o polimorfismo A2756G *MTR*.

**Conclusão:** Estes resultados demonstram um papel importante do polimorfismo A2756G *MTR* e do metabolismo do folato no desenvolvimento e evolução da DC.

**Palavras-Chave:** Doença de Crohn; Folato; Metionina Sintetase; homocisteína

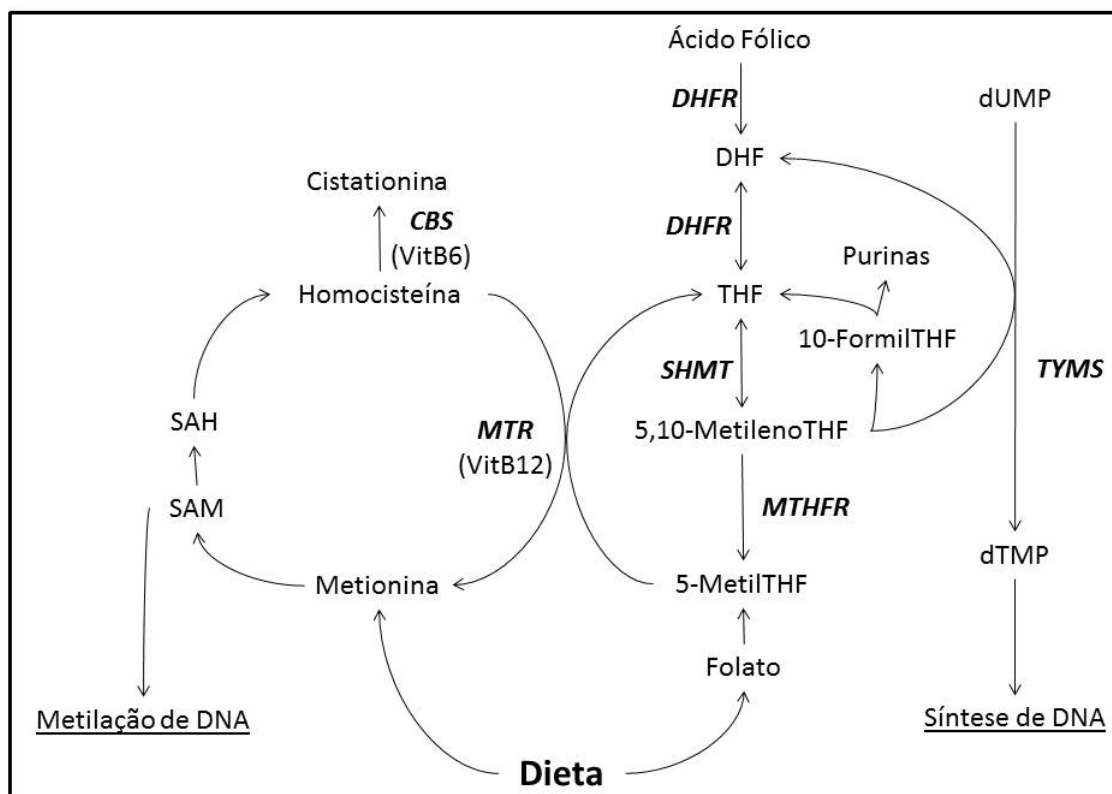
## **INTRODUÇÃO**

A Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória do tracto gastrointestinal que afecta milhões de pessoas em todo o mundo especialmente nos países desenvolvidos, apresentando uma menor incidência em África e Ásia (1-4).

Esta patologia caracteriza-se por ser uma doença inflamatória transmural que pode envolver várias regiões do tracto gastrointestinal desde a boca até ao ânus, sendo que entre 40% dos casos envolvem a regiões do cólon e íleo (5). Os principais sintomas apresentados por doentes com DC são a dor abdominal, desregulação da função intestinal e a hemorragia rectal (6, 7), podendo apresentar outros sintomas como náusea, febre, vômito entre outros (8). Para além das manifestações no tracto gastrointestinal a DC pode apresentar manifestações extra-intestinais nomeadamente complicações oculares, músculo-esqueléticas, vasculares e renais (9). Algumas das manifestações extra-intestinais têm sido associadas a um aumento da homocisteína encontrada em pacientes com DC (10-16). Para além de associada a estas manifestações extra-intestinais a hiperhomocisteinemia foi associada a uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro colo-rectal (17). Este aumento da homocisteína tem sido associado à deficiência de algumas vitaminas nestes doentes, nomeadamente vitamina B6, vitamina B12 e folato (12, 15). Esta associação poderá estar relacionada com o metabolismo da homocisteína pela enzima metionina sintetase (MTR). A MTR é uma enzima do ciclo do ácido fólico (Figura 1) que catalisa a reacção de transferência do grupo metil do 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) para a homocisteína dando origem a metionina, tendo a cobalamina (vitamina B12) como cofactor. Em termos celulares este processo de produção de metionina é extremamente importante pois a metionina está na origem da SAM que é o principal dador de grupos metil para a metilação de ácidos nucleicos e proteínas na célula (18-20).

O gene *MTR* contém o polimorfismo A2756G que corresponde a uma substituição não-sinónima de uma adenina por uma guanina, resultando na alteração de um ácido aspártico por uma glicina (D919G) na proteína (18, 19, 21). Existem, no entanto, estudos que relacionam o alelo G a um aumento da homocisteína e diminuição da metilação, associando esta alteração a uma menor actividade da enzima MTR (22-25). No entanto poucos estudos têm sido efectuados na tentativa de relacionar este polimorfismo com a DC, e nenhum deles feito fora do continente asiático (23, 26).

Assim com este estudo propomos investigar uma possível associação entre o polimorfismo MTR A2756G e a susceptibilidade para o desenvolvimento ou evolução da DC, assim como a sua interacção com a ingestão de diversos nutrientes.



**Figura 1.** Ciclo do Folato

As enzimas encontram-se em negrito e itálico. CBS (cistationina-β-sintase), DHFR (dihidrofolato reductase), MTR (metionina sintetase), MTHFR (metilenotetrahydrofolato reductase), SHMT (serina hidroximetiltransferase), TS (timidilato sintetase). 5,10-metilenoTHF (5,10 metilenetetrahydrofolato), 5-metilTHF (5-metiltetrahydrofolato), 10-formilTHF (10-formiltetrahydrofolato), DHF (dihidrofolato), dTMP (deoxithimidina monofosfato), dUMP (deoxiuridina monofosfato), SAH (S-Adenosilhomocisteína), SAM (S-adenosilmetionina), THF (tetrahydrofolato), VitB6 (vitamina B6), VitB12 (vitamina B12)

## OBJECTIVO

O objectivo deste estudo foi investigar o papel do polimorfismo A2756G do gene *MTR* como factor de susceptibilidade na DC, assim como factor influenciador no fenótipo da doença. Investigámos também o papel da ingestão dietética de determinados nutrientes, nomeadamente de folato, vitamina B12 e álcool, no fenótipo da doença e a sua possível interacção com o polimorfismo A2756G *MTR*.

## METODOLOGIA

### *Pacientes com Doença de Crohn e População Controlo*

Para este estudo foram seleccionados 82 pacientes com DC diagnosticada, provenientes do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) e do Hospital Universitário de Santa Maria de Lisboa. Os critérios de diagnóstico haviam sido estabelecidos previamente (28), tendo a

actividade da doença sido classificada de acordo com o Índice Harvey-Bradshaw (IHB) (29). O IHB determinado corresponde ao valor determinado em pelo menos 3 das consultas efectuadas durante o último ano. Nesta população constavam 33 indivíduos do sexo masculino (40,2%) e 49 do sexo feminino (59,8%) sendo a idade média  $39,5 \pm 14,0$  anos. Foram seleccionados 116 indivíduos provenientes do grupo de dadores de sangue ou voluntários do IPOFG, sem histórico de doença inflamatória do intestino, de forma a constituírem uma população controlo. Neste grupo constavam 51 indivíduos do sexo masculino (44%) e 65 do sexo feminino (56%) com uma idade média de  $49,7 \pm 11,8$  anos.

Todos os indivíduos seleccionados deram o seu consentimento informado por escrito antes do início do estudo, estando os resultados daí resultantes sujeitos a anonimato. O estudo foi realizado de acordo com os critérios da declaração de Helsínquia (30) aprovado pelos Comitês Científico de Ética do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) e do Hospital Universitário de Santa Maria.

### **Avaliação Nutricional**

A avaliação da ingestão nutricional foi realizada através de um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar devidamente validado para a população portuguesa (31). Foi solicitado aos participantes do estudo que recordassem os seus hábitos alimentares no ano anterior ao inquérito. No questionário os indivíduos tinham 86 itens alimentares, com 9 respostas possíveis relativamente à frequência média de consumo (nunca ou menos que uma vez por dia até seis ou mais vezes por dia), e com três respostas possíveis para a porção (menor, igual ou superior à porção média). Os dados foram analisados numa base de dados modificada do *software* Food Processor Plus, versão 7 (ESHA Research, Salem, OR), que inclui alguns itens de alimentos Portugueses e permite a quantificação dos diferentes macro e micronutrientes. Foram também incluídos e quantificados nesta análise suplementos vitamínicos a que alguns indivíduos estavam sujeitos.

### **Genotipagem**

Aos pacientes com DC foi recolhido sangue total por via venosa, tendo sido extraído posteriormente o DNA através do método de fenol-clorofórmio. Aos indivíduos da população controlo foi recolhido sangue por punção digital para cartão Generation Capture Card Kit-DNA Purification; DNA Elution (Gentra Systems Inc, Minneapolis, MN), de acordo com o protocolo do fabricante.

O polimorfismo A2756G do gene *MTR* foi genotipado por PCR em Tempo-Real, recorrendo a Assays-by-Design TaqMan para análise de discriminação alélica (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). As reacções foram realizadas com a mistura de: 4 µl de DNA genómico,



10 µl de iQ™ Supermix (Bio-Rad, Hercules, California, EUA), 1µL de 20X assay mix e ddH<sub>2</sub>O até perfazer 20 µl de volume final. Foi usado o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação a 95°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 92°C durante 15 s, e hibridação e extensão a 60°C durante 1 min. Todas as reacções foram realizadas no iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, California, EUA). O genótipo foi determinado de acordo com a fluorescência emitida pelas sondas específicas para cada alelo.

### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, como número (e percentagem) de indivíduos, ou como odds ratio (OR) com IC de 95%. A análise bivariada foi realizada utilizando o teste *t* de Student ou teste Mann-Whitney para variáveis contínuas, e o teste qui-quadrado para variáveis categóricas. Foi usada regressão logística múltipla para avaliar as variáveis relacionadas com o risco de CCR. A significância das interacções foi calculada através do teste likelihood ratio comparando o modelo de interacção com outro contendo apenas o efeito de 2 variáveis. O nível de significância foi estabelecido para um  $P < 0,05$ .

A análise estatística foi realizada através do *software* SPSS versão 17.0 para WINDOWS (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EUA)

## **RESULTADOS**

As características dos pacientes com DC (33 homens (40,2%) e 49 mulheres (59,8%); média de idades 39,5 $\pm$ 14,0 anos) encontram-se descritas na Tabela 1. Podemos verificar na Tabela 2 a ingestão média diária de macro e micronutrientes na população de pacientes e na população controlo. A avaliação da ingestão dos macronutrientes e de alguns micronutrientes havia sido analisada anteriormente para esta população (32). Neste estudo demos particular atenção a nutrientes envolvidos nas reacções metabolizadas pela MTR, nomeadamente o consumo de folato, vitamina B12 e álcool. Dado que a ingestão energética foi significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) nos doentes em comparação com os controlos, a ingestão dos macro e micronutrientes foi ajustada para a ingestão energética. Tal como reportado anteriormente (32), na comparação entre os dois grupos é possível observar que, para além da ingestão calórica, existem diferenças estatisticamente significativas na ingestão de glícidos e fibra, não havendo diferenças no consumo de proteínas e gordura total. Nos nutrientes micronutriente verificámos uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos para o consumo de folato, não havendo diferenças no que se refere ao consumo de álcool e vitamina B12.

**Tabela 1 – Características dos pacientes de DC**

<b>Característica</b>	
Idade de diagnóstico <sup>a</sup> (anos)	28,5 ± 11,7
Anos de doença <sup>a</sup> (anos)	11,1 ± 8,6
<i>História Familiar<sup>b</sup></i>	
Sim	8,5% (7)
Não	91,5% (75)
<i>Localização<sup>b</sup></i>	
Íleo	28% (23)
Cólon	17,1% (14)
Íleo + Cólon	54,9% (45)
<i>Localização Perianal<sup>b</sup></i>	
Sim	28% (23)
Não	72% (59)
<i>Localização Gastroduodenal<sup>b</sup></i>	
Sim	12,2% (10)
Não	87,8% (72)
<i>Apresentação<sup>b</sup></i>	
Inflamatória	29,3% (24)
Fistulizante	32,9% (27)
Estenosante	37,8% (31)
<i>Recessões<sup>b</sup></i>	
Sim	50% (41)
Não	50% (41)
<i>Manifestações extra-intestinais<sup>b</sup></i>	
Sim	41,5% (34)
Não	58,5% (48)

a – Média ± Desvio padrão. b – Percentagem (n).

**Tabela 2 - Ingestão Média Diária de Macro e Micronutriente**

<b>Nutrientes</b>	<b>Doentes de Crohn</b>	<b>Controlos</b>	<b>P</b>
Energia (kcal/d)	2214,2 ± 724,6	3056,3 ± 1013,4	<0,05
Proteínas (g/d)	99,5 ± 36,3	133,1 ± 48,7	NS
Glícidos (g/d)	247,8 ± 110,3	304,7 ± 94,1	<0,05
Gordura total (g/d)	80,8 ± 29,1	135,0 ± 65,5	NS
Fibra (g/d)	20,2 ± 10,2	31,3 ± 11,1	<0,05
Álcool (g/d)	2,8 ± 9,1	20,7 ± 49,4	NS
Vitamina B12 (µg/d)	7,8 ± 6,4	13,1 ± 7,0	NS
Folato (µg/d)	221,5 ± 187,0	457,9 ± 144,1	<0,05

Os dados relativos à ingestão nutricional estão expressos como média ± desvio padrão.

Teste de análise univariada comparando casos e controlos, ajustados para consumo de calorias.

NS = Não significativo.

Na população dos pacientes foi ainda estudada a possível associação da ingestão dos nutrientes com as manifestações e características da doença. Foi possível observar uma relação inversa entre o consumo de folato e a presença de manifestações extra-intestinais da doença ( $P<0.05$ ). Os pacientes que apresentam manifestações extra-intestinais têm um consumo de folato inferior aos restantes pacientes. Não foi encontrada qualquer outra associação entre a ingestão de nutrientes e características da doença.

Podem-se observar na Tabela 3 os dados relativos às frequências genótípicas do polimorfismo A2756G do gene *MTR* nas duas populações estudadas. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre as distribuições genótípicas nas duas populações ( $P<0.05$ ). Os indivíduos heterozigóticos apresentam um risco cinco vezes superior de DC (OR=5,1; IC 95%=2,2-12,0) e os indivíduos homozigóticos GG apresentam um risco 16 vezes superior para a DC (OR=16,5; IC 95%=2,3-120,7) quando comparados com o genótipo AA.

**Tabela 3** – Distribuição Genotípica do Polimorfismo A2756G *MTR* e Risco de DC

	Doentes de Crohn % (n)	Controlos % (n)	P	OR IC 95%
<i>MTR</i> A2756G				
AA	26,3% (20)	73,3% (85)		1
AG	64.5% (49)	25,0% (29)	<0.05	5,1 (2,2-12,0)
GG	9,2% (7)	1,7% (2)		16,5 (2,3-120,7)

OR – odds ratio

Os valores de *P* são resultado do teste de q-quadrado. O genótipo AA foi a categoria de referência para o cálculo do OR (regressão múltipla). OR ajustado para idade e género.

Foi possível observar ainda uma relação entre o polimorfismo A2756G e a idade de diagnóstico nos pacientes. Os indivíduos que possuem o alelo G (AG e GG) têm uma idade de diagnóstico significativamente mais precoce quando comparados com os indivíduos AA ( $26,3\pm9,6$  vs  $32,4\pm12,1$ ;  $P<0.05$ ). Estes indivíduos apresentam ainda uma redução do risco de apresentarem a doença com localização perianal (OR=0,26; IC 95%=0,08-0,9;  $P<0,05$ ) quando comparados com os indivíduos com genótipo AA. Verificou-se ainda uma tendência para os indivíduos que possuem o alelo G de apresentarem história familiar. Todos os indivíduos com história familiar ( $n=7$ ) apresentavam o alelo G no seu genótipo. Esta associação não apresenta no entanto valores estatisticamente significativos. Não foram encontradas quaisquer outras associações entre polimorfismo e outras manifestações da patologia.

No que se refere ao estudo das interacções entre os nutrientes e o polimorfismo no decurso da doença e suas manifestações foram estudadas as interacções entre o polimorfismo e o consumo de álcool, fibra, folato e vitamina B12. Não foi encontrada qualquer interacção estatisticamente significativa entre o consumo destes nutrientes e o polimorfismo A2756G do gene *MTR*.

## **DISCUSSÃO**

Os estudos realizados nos últimos anos têm consolidado os factores genéticos e ambientais como factores essenciais na determinação da susceptibilidade de DC e na evolução da patologia (33). No presente estudo foi estudado o efeito do polimorfismo A2756G do gene *MTR*, bem como a sua interacção com factores nutricionais, na susceptibilidade da DC e na actividade da patologia.

As diferenças observadas na ingestão de alguns macronutrientes (glícidos), da fibra e da ingestão calórica total entre os pacientes com DC e a população controlo haviam sido previamente descritas e explicadas pelo nosso grupo de trabalho (32). Tais diferenças poderão estar relacionadas com restrições alimentares por indicação médica ou por iniciativa própria, influenciando assim o consumo de alguns destes nutrientes (32).

Dos micronutrientes estudados apenas o consumo de folato se encontrava significativamente reduzido nos pacientes com DC. Esta ingestão diminuída de micronutriente já foi observada em estudos anteriores (34, 35) podendo estar relacionada com o facto de os doentes evitarem determinado tipos de alimentos, nomeadamente vegetais, que produzam um maior volume de resíduos levando a uma aumento do desconforto do doente. Esta diminuição do consumo de vegetais está directamente relacionada com a diminuição do consumo de folato dado que este encontra-se essencialmente nos vegetais. No grupo dos pacientes de Crohn foi possível observar ainda uma associação estatisticamente significativa entre o consumo de folato e a existência de manifestações extra-intestinais. Indivíduos com menor ingestão de folato têm uma maior probabilidade de desenvolver manifestações extra-intestinais da doença. Esta é, de nosso conhecimento, a primeira vez que tal associação é encontrada de forma directa. Este resultado pode ser explicado pelo facto de o folato estar envolvido em vias metabólicas extremamente importantes para a célula através do ciclo do folato (36). Alterações no consumo de folato têm sido associadas a diversas patologias, nomeadamente doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e cancro colo-rectal (37-39). As doenças cardiovasculares e neurológicas são exactamente dois tipos de manifestações extra-intestinais associadas à DC (40-42). Embora não haja ainda uma explicação para o aparecimento das doenças neurológicas, para o caso das doenças cardiovasculares os elevados valores de homocisteína encontrados nos pacientes são considerados factores de risco (43, 44). O folato é um factor essencial no metabolismo da homocisteína uma vez que origina 5-metiltetrahidrofolato, um substrato na metilação da homocisteína em metionina levada a cabo pelo gene *MTR* (18). Desta forma baixos níveis de folato podem levar a que exista uma menor concentração de 5-MTHF e assim a reacção não possa ocorrer levando a uma acumulação da homocisteína, podendo resultar numa situação de hiperhomocisteinemia. Esta situação é, como já referido anteriormente, um factor de risco para as doenças cardiovasculares, contribuindo assim para explicar a associação encontrada entre os baixos consumos de folato e a existência de manifestações extra-intestinais. Assim, é importante corrigir a alimentação nos doentes com DC de forma a corrigir estas alterações específicas na

sua ingestão de determinados nutrientes, podendo mesmo recorrer-se a suplementação para esse efeito (45).

O estudo do efeito do polimorfismo A2756G do gene *MTR* na DC, do nosso conhecimento actual, foi apenas realizado na China, não tendo sido encontrada qualquer associação entre polimorfismo e DC, tendo sido associado a colite ulcerosa (23, 26). Desta forma o nosso estudo é o primeiro a ser realizado numa população ocidental e é o primeiro a identificar o alelo G do polimorfismo como factor de susceptibilidade de desenvolver DC. Os nossos resultados demonstram um risco aumentado até 16 vezes superior para os indivíduos homozigóticos GG. O gene *MTR* está envolvido no metabolismo do folato, levando à formação de metionina através de uma reacção de metilação da homocisteína (18). O papel do polimorfismo não está completamente esclarecido mas alguns autores associam este polimorfismo a uma diminuição da actividade da proteína, levando a um aumento da homocisteína (23, 24). O aumento da homocisteína, por seu turno, parece estar relacionado com o desencadear de uma resposta auto-imune, podendo estar assim na origem ou na evolução da DC (46). O aumento da homocisteína pode conduzir a esta resposta auto-imune através da modificação de proteínas levando ao surgimento de novos antígenos que desencadeariam a resposta auto-imune (46). Assim fica claro a importância do polimorfismo A2756G na susceptibilidade para a DC. Encontrámos ainda uma associação entre o polimorfismo e a idade de diagnóstico. Indivíduos com o alelo G (AG e GG) apresentavam uma idade de diagnóstico significativamente mais baixa que os indivíduos com o genótipo AA. Esta associação poderá estar relacionada com um evoluir mais rápido da doença devido ao aumento dos níveis de homocisteína e consequentemente da resposta auto-imune dos indivíduos como visto anteriormente. Um estudo recente numa população portuguesa demonstra a existência de correlação entre elevados níveis de homocisteína e a idade mais baixa dos pacientes, suportando assim os nossos resultados (47). O alelo G do polimorfismo A2756G surge ainda como um factor de protecção para a presença perianal da doença. Não encontrámos no entanto qualquer explicação para esta situação, sendo necessário mais estudos que possam comprovar e ajudar a explicar este resultado.

Desta forma com este estudo podemos concluir que o ciclo do folato parece desempenhar um papel importante na origem e desenvolvimento da DC nomeadamente através da acção do gene *MTR* e do seu substrato, o folato. Este é o primeiro estudo a mostrar uma associação entre o polimorfismo do gene *MTR* e a susceptibilidade da DC bem como com a idade de diagnóstico. Esta associação surge reforçada com o resultado observado entre o consumo de folato e a possibilidade de manifestações extra-intestinais. No desencadear de todas estas situações parece estar o aumento homocisteína resultante de uma actividade alterado da metionina sintetase resultante quer do seu polimorfismo, quer do baixo consumo de folato. Estes resultados são de extrema importância para a determinação precoce de riscos de desenvolvimento da DC através do estudo de polimorfismo, bem como para uma modelação da terapia a aplicar aos doentes de acordo com o seu genótipo de forma a prevenir complicações e levar a uma remissão mais rápida da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hovde O, Moum BA. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(15):1723-31.
2. Baumgart DC, Bernstein CN, Abbas Z, Colombel JF, Day AS, D'Haens G, et al. IBD Around the world: comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: proceedings of the World Digestive Health Day 2010--Inflammatory Bowel Disease Task Force meeting. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(2):639-44.
3. Ahuja V, Tandon RK. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. *Journal of digestive diseases*. 2010;11(3):134-47.
4. Michel P, St-Onge L, Lowe AM, Bigras-Poulin M, Brassard P. Geographical variation of Crohn's disease residual incidence in the Province of Quebec, Canada. *International journal of health geographics*. 2010;9:22.
5. Latella G, Papi C. Crucial steps in the natural history of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(29):3790-9.
6. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94.
7. Vatn MH. Natural history and complications of IBD. *Current gastroenterology reports*. 2009;11(6):481-7.
8. Beattie RM, Croft NM, Fell JM, Afzal NA, Heuschkel RB. Inflammatory bowel disease. *Archives of disease in childhood*. 2006;91(5):426-32.
9. Ephgrave K. Extra-intestinal manifestations of Crohn's disease. *The Surgical clinics of North America*. 2007;87(3):673-80.
10. Lambert D, Benhayoun S, Adjalla C, Gelot MA, Renkes P, Felden F, et al. Crohn's disease and vitamin B12 metabolism. *Digestive diseases and sciences*. 1996;41(7):1417-22.
11. Koutroubakis IE, Dilaveraki E, Vlachonikolis IG, Vardas E, Vrentzos G, Ganotakis E, et al. Hyperhomocysteinemia in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*. 2000;45(12):2347-51.
12. Kallel L, Feki M, Sekri W, Segheir L, Fekih M, Boubaker J, et al. Prevalence and risk factors of hyperhomocysteinemia in Tunisian patients with Crohn's disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 2011;5(2):110-4.
13. Casella G, Antonelli E, Di Bella C, Di Marco E, Piatti M, Villanacci V, et al. Hyperhomocysteinemia in patients with Crohn's disease. *Techniques in coloproctology*. 2013.
14. Bernstein CN. Is hyperhomocysteinemia associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease? *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*. 2007;4(10):550-1.

15. Saibeni S, Cattaneo M, Vecchi M, Zighetti ML, Lecchi A, Lombardi R, et al. Low vitamin B(6) plasma levels, a risk factor for thrombosis, in inflammatory bowel disease: role of inflammation and correlation with acute phase reactants. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(1):112-7.
16. Younes-Mhenni S, Derex L, Berruyer M, Nighoghossian N, Philippeau F, Salzmann M, et al. Large-artery stroke in a young patient with Crohn's disease. Role of vitamin B6 deficiency-induced hyperhomocysteinemia. *Journal of the neurological sciences*. 2004;221(1-2):113-5.
17. Phelip JM, Ducros V, Faucheron JL, Flourie B, Roblin X. Association of hyperhomocysteinemia and folate deficiency with colon tumors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2008;14(2):242-8.
18. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(6):3628-34.
19. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Human molecular genetics*. 1996;5(12):1867-74.
20. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human molecular genetics*. 1996;5(12):1851-8.
21. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2004;159(5):423-43.
22. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer research*. 2002;62(15):4519-24.
23. Jiang Y, Xia X, Wang W, Lin L, Xu C, Cai Z, et al. Hyperhomocysteinemia and related genetic polymorphisms correlate with ulcerative colitis in Chinese Han population in Central China [corrected]. *Cell biochemistry and biophysics*. 2012;62(1):203-10.
24. Ashavaid TF, Shalia KK, Kondkar AA, Todur SP, Nair KG, Nair SR. Gene polymorphism and coronary risk factors in Indian population. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2002;40(10):975-85.
25. Naushad SM, Jain Jamal MN, Prasad CK, Rama Devi AR. Relationship between methionine synthase, methionine synthase reductase genetic polymorphisms and deep vein thrombosis among South Indians. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2008;46(1):73-9.
26. Chen M, Peyrin-Biroulet L, Xia B, Gueant-Rodriguez RM, Bronowicki JP, Bigard MA, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis, in Central China. *BMC medical genetics*. 2008;9:78.

27. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2012;3(1):21-38.
28. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement*. 1989;170:2-6; discussion 16-9.
29. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.
30. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Journal international de bioethique = International journal of bioethics*. 2004;15(1):124-9.
31. Lopes C. Reprodutibilidade e validação do questionário semiquantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e Enfarte agudo do miocárdio: Estudo de caso-controlo de base comunitária*. Tese de doutoramento. 2000:78-115.
32. Sousa Guerreiro C, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, et al. A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case-control study. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102(11):2551-6.
33. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369(9573):1627-40.
34. Fernandez-Banares F, Cabre E, Gonzalez-Huix F, Gassull MA. Enteral nutrition as primary therapy in Crohn's disease. *Gut*. 1994;35(1 Suppl):S55-9.
35. Filippi J, Al-Jaouni R, Wiroth JB, Hebuterne X, Schneider SM. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(3):185-91.
36. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr*. 2012;3(1):21-38.
37. Folic acid for the prevention of neural tube defects. *American Academy of Pediatrics. Committee on Genetics. Pediatrics*. 1999;104(2 Pt 1):325-7.
38. Holmquist C, Larsson S, Wolk A, de Faire U. Multivitamin supplements are inversely associated with risk of myocardial infarction in men and women--Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *The Journal of nutrition*. 2003;133(8):2650-4.
39. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(8):601-14.
40. de Lau LM, de Vries JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Siepman DA, Sillevs Smitt PA, et al. Acute CNS white matter lesions in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2009;15(4):576-80.



41. Principi M, Mastrolonardo M, Scicchitano P, Gesualdo M, Sassara M, Guida P, et al. Endothelial function and cardiovascular risk in active inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's & colitis*. 2013.
42. Gandhi S, Narula N, Marshall JK, Farkouh M. Are patients with inflammatory bowel disease at increased risk of coronary artery disease? *The American journal of medicine*. 2012;125(10):956-62.
43. Nakano E, Taylor CJ, Chada L, McGaw J, Powers HJ. Hyperhomocystinemia in children with inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2003;37(5):586-90.
44. Dagli N, Poyrazoglu OK, Dagli AF, Sahbaz F, Karaca I, Kobat MA, et al. Is inflammatory bowel disease a risk factor for early atherosclerosis? *Angiology*. 2010;61(2):198-204.
45. Goh J, O'Morain CA. Review article: nutrition and adult inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2003;17(3):307-20.
46. Lazzerini PE, Capecchi PL, Selvi E, Lorenzini S, Bisogno S, Galeazzi M, et al. Hyperhomocysteinemia, inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2007;6(7):503-9.
47. Magalhães J, Rosa B, Moreira M, Barbosa M, Rebelo A, Leite S, et al. Factors associated with hyperhomocysteinemia in Portuguese patients with inflammatory bowel disease. 2013.



## **CAPÍTULO 4**

---



## **I. DISCUSSÃO**

O conceito do modo como os factores genéticos influenciam o desenvolvimento e aparecimento de determinadas patologias tem-se alterado e complexificado ao longo dos anos. O paradigma de patologias causadas por um só gene que segue um padrão mendeliano de hereditariedade não é aplicável a patologias complexas e com origem multifactorial. Ao não seguirem este padrão de hereditariedade a identificação de factores genéticos que influenciem estas patologias tornou-se mais complexa e menos bem sucedida (1, 2). Ao juntarmos a este facto a existência dos factores não-genéticos que podem influenciar o desenvolvimento da doença, o grau de complexidade aumenta exponencialmente. Este é o caso das doenças oncológicas onde os factores genéticos interagem com factores ambientais no desenvolvimento da patologia (3). Dos factores ambientais o que mais se tem destacado nos últimos anos é o padrão alimentar. A importância do estudo dos factores nutricionais em conjunto com o estudo do perfil genético dos indivíduos tem vindo a ser cada vez mais destacada pela comunidade científica, na perspectiva de melhor se perceber a etiologia de determinados tipos de cancro, bem como na perspectiva de se poder vir a desenvolver um aconselhamento nutricional personalizado (4, 5). Uma das vias metabólicas onde a interacção de factores nutricionais e genéticos acontece é o ciclo do folato. Neste ciclo vários nutrientes, tais como a vitamina B12, vitamina B6 e folato, actuam como co-factores ou como substratos de diversas enzimas, desempenhando uma papel essencial no correcto funcionamento da via metabólica (6). Assim, o estudo da influência destes factores nutricionais, em interacção com factores genéticos (polimorfismos, expressão) de diversos integrantes do ciclo do folato, no desenvolvimento de certas patologias torna-se pertinente (7). O conjunto dos quatro estudos apresentados na presente tese tem como objectivo conhecer melhor o papel das alterações genéticas em genes do ciclo do folato, em interacção com factores nutricionais e de estilo de vida, não só no desenvolvimento de cancro colo-rectal, mas também no desenvolvimento de outra patologia do tracto gastrointestinal, a doença de Crohn. Estes estudos, a serem confirmados, permitirão a longo prazo definir factores de susceptibilidade e de prognóstico, assim como um aconselhamento nutricional personalizado que permitam uma diminuição do risco de desenvolver as patologias em estudo.

### ***Cancro Colo-rectal***

A influência de factores genéticos e nutricionais no desenvolvimento de CCR tem sido amplamente estudada nos últimos anos (8). No entanto em Portugal poucos são os trabalhos que estudaram a influência de factores nutricionais (9-11), e ainda menos os que abrangeram factores genéticos e nutricionais, no desenvolvimento de CCR (12, 13), sendo que nenhum deles se debruçou sobre o papel de alterações nos genes do ciclo do folato e a sua interacção com factores nutricionais.

Numa primeira abordagem avaliámos a ingestão nutricional, em particular dos nutrientes envolvidos no ciclo do folato (folato, metionina, vitamina B6, vitamina B12, glicina e serina), em conjunto com o estudo do polimorfismo A2756G *MTR*, numa população de pacientes com CCR e numa população controlo (14). Os resultados da avaliação nutricional permitiram-nos concluir que dos nutrientes avaliados apenas o consumo do folato estava associado ao desenvolvimento de CCR. Verificámos que um consumo de folato acima de 407,6 µg/dia tinha um efeito protector para o desenvolvimento de CCR (OR=0.67; IC95%=0,45 – 0,99; P<0,05). Este resultado está de acordo com os estudos previamente realizados como foi demonstrado numa recente meta-análise por Kennedy *et al* (15), embora existam alguns autores que defendam a hipótese de um elevado consumo de folato estar associado a um aumento de risco de CCR e não a uma diminuição (16, 17). De ressaltar no entanto que os resultados obtidos pelos estudos que associam os níveis elevados de folato a um risco aumentado de CCR, se podem dever a suplementação por ácido fólico, atingindo-se níveis de folato muito superiores aos valores obtidos pela alimentação. O efeito protector da elevada ingestão de folato está ligado ao seu papel no ciclo do folato, nomeadamente como dador de grupos metil essenciais para a metilação do DNA e também para a produção de timidilato necessário para a reparação e replicação do DNA (18, 19). É difícil perceber qual destes mecanismos será o principal para levar a um aumento do risco quando se dá um baixo consumo de folato. Por um lado é sabido que alterações no padrão de metilação de DNA são um fenómeno precoce no processo carcinogénico, ocorrendo mesmo antes de ser possível detectar alterações pré-neoplásicas a nível celular (20). Por outro lado a reparação do DNA é essencial para a manutenção da integridade genómica, impedindo as quebras cromossómicas devido à incorporação de uracilo (21). Deste modo verificamos que ambos os processos podem estar na origem do aumento da susceptibilidade de CCR quando o consumo de folato é baixo, sendo possível que o resultado observado seja uma conjugação do papel do folato nos dois mecanismos celulares. Existe ainda uma terceira hipótese para o papel do folato no processo carcinogénico envolvendo o metabolismo da homocisteína. A homocisteína é metabolizada no ciclo do folato, sendo convertida em metionina pela enzima MTR, utilizando como substrato 5-MTHF que é originado a partir do folato proveniente da dieta (22). Uma diminuição do consumo de folato levará a um aumento dos níveis de homocisteína, podendo originar uma situação de hiperhomocisteínemia (23). Níveis elevados de homocisteína têm sido associados a um aumento do risco de CCR devido a um estímulo da proliferação celular (24, 25). Assim, se considerarmos estes três mecanismos, podemos por a hipótese de que um baixo consumo de folato levará a uma diminuição dos níveis de metilação, influenciando a regulação da expressão génica, em conjunto com o aumento da homocisteína, que estimula a proliferação celular, e com uma diminuição dos níveis de timidilato, o que leva a um aumento da incorporação de uracilo criando instabilidade genética. Este será assim um ambiente propício ao processo carcinogénico.

Quando estudámos o possível efeito do polimorfismo A2756G *MTR* verificámos não haver uma associação do genótipo GG com o desenvolvimento de CCR (OR=0.77; IC95%=0.18 - 3.3). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros estudos (26-28) e com uma meta-

análise recente (29), havendo no entanto alguns estudos que indiquem que o genótipo GG poderá ser um factor de risco para o desenvolvimento quer de adenomas (30), quer para o desenvolvimento de adenocarcinomas do cólon (31). Apesar do papel deste polimorfismo no funcionamento da enzima não estar totalmente esclarecido alguns estudos indicam que possa estar associado a uma menor capacidade de metabolização por parte desta, levando a uma diminuição da produção de metionina e de THF, e a um aumento da homocisteína (32-34). Como referido anteriormente isto poderia levar a uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de CCR pois iria levar a uma diminuição da metilação do DNA, a uma menor produção de dTMP devido à menor quantidade de THF disponível para produzir 5,10-MTHF (substrato da TYMS), e a um estímulo da divisão celular por parte do aumento da homocisteína. O facto de tal não se verificar poderá ter resultado de uma dissimulação da influência do polimorfismo devido ao efeito dos baixos níveis de folato observados e pelo efeito encontrado nesta população do polimorfismo C677T MTHFR. Nesta população verificou-se que os indivíduos com o genótipo TT do polimorfismo C677T MTHFR tinham uma susceptibilidade 3 vezes superior de desenvolver CCR (OR=3,01; IC95%=1,3-6,7). Observou-se ainda uma interacção estatisticamente significativa destes indivíduos com o baixo consumo de folato, levando a que o risco passasse para 14 vezes (OR=14,0; IC95%=1,8-108,5). A conjugação destes efeitos leva a que dentro da célula haja uma menor disponibilidade de 5-MTHF, quer pelo baixo consumo de folato, quer pela baixa produção a partir da reacção catalisada pela MTHFR. Deste modo existirá uma baixa concentração do substrato da MTR, fazendo com que o possível efeito do polimorfismo A2756G se torne menos evidente. Independentemente da capacidade de metabolização da enzima, a baixa concentração de substrato levará sempre a uma situação de risco, com o aumento da homocisteína, diminuição de metionina e de THF. Outra situação que poderá atenuar um possível efeito deste polimorfismo é o facto de algumas das alterações provocadas (aumento da homocisteína, diminuição da metionina) poderem ser compensadas pela célula. Os baixos níveis de metionina poderão ser parcialmente compensados pela metionina proveniente da dieta. A acumulação da homocisteína poderá ser compensada pela metabolização desta através de outra via metabólica envolvendo a enzima cistationina  $\beta$ -sintetase (CBS) produzindo cistationina (35).

Não foram encontradas quaisquer interacções estatisticamente significativas entre o polimorfismo A2756G MTR e os outros polimorfismos estudados (MTHFR C677T e SHMT1 C1420T), nem entre o polimorfismo e a ingestão dos nutrientes avaliados (folato, vitamina B6, vitamina B12, metionina, serina e álcool). Estes resultados são similares aos obtidos por estudos anteriores (36, 37), embora um deles resulte do estudo de populações com diferente *background* genético (Afro-Americanos, Hispânicos e Caucasianos) (36). Um estudo anterior encontrou uma interacção significativa entre este polimorfismo e o consumo de metionina e de álcool, no risco de desenvolver adenomas colo-rectais em mulheres (28).

Apesar de o polimorfismo A2756G não ter mostrado uma associação com o risco de desenvolvimento de CCR, quer por si, quer em interacção com factores nutricionais ou com outros polimorfismos, encontrou-se uma associação estatisticamente significativa do genótipo GG com a história familiar de CCR em familiares de primeiro ou segundo grau (OR=3,92;

IC95%=1,05-14,66). Este resultado reforça a hipótese de o efeito do polimorfismo A2756G estar encoberto pelo efeito dos baixos níveis de folato e do polimorfismo C677T *MTHFR*.

Num estudo posterior foi avaliado o papel de dois polimorfismos do gene *TYMS* no desenvolvimento de CCR (38). Os polimorfismos estudados foram um polimorfismo de repetição de 28pb na região promotora do gene que pode conter 2 (2R) ou 3 repetições (3R), e um polimorfismo de deleção de 6pb na região 3'UTR do gene. Para além do papel dos polimorfismos foi ainda investigada uma possível interacção entre estes polimorfismos e a ingestão de nutrientes do ciclo do folato (folato, vitamina B6 e vitamina B12).

Da análise do polimorfismo de repetição verificou-se não haver qualquer diferença estatisticamente significativa nas duas populações estudadas. Desta forma não se verificou uma variação do risco de desenvolver CCR para qualquer dos genótipos deste polimorfismo, embora se verifique uma tendência para o aumento do risco dos indivíduos com genótipo 2R/3R+3R/3R (OR=1,29; IC95%=0,71-2,36). Os estudos anteriores realizados sobre a importância deste polimorfismo como factor de risco para o desenvolvimento de CCR têm resultados variáveis. Alguns destes trabalhos indicam o alelo 3R como factor de risco para CCR (39), enquanto outros não encontram qualquer associação ou encontram mesmo uma associação inversa (40). Torna-se assim claro que o efeito deste polimorfismo nesta patologia é muito variável dependendo da população estudada e, muito provavelmente, de outros factores genéticos e ambientais a que essa população esteja sujeita. Os estudos realizados até ao momento referem que este polimorfismo estará envolvido no controlo da expressão do gene, embora haja alguma discordância sobre a que nível este polimorfismo actuará nesse controlo. Alguns trabalhos sugerem que este polimorfismo estará envolvido na eficácia da transcrição do gene, regulando assim os níveis de mRNA da *TYMS*, sendo o alelo 3R responsável por uma maior taxa de transcrição (41). Outros autores sugerem que o polimorfismo afectará a eficácia do processo de tradução do mRNA da *TYMS*, afectando assim os níveis de proteína, sendo o alelo 3R responsável por uma tradução mais eficaz (42). De qualquer forma todos os estudos acabam por mostrar que o alelo 3R levava a uma maior expressão do gene na célula. Dado que a *TYMS* tem como função converter o dUMP em dTMP utilizando como substrato o 5,10-MTHFR, mantendo assim um *pool* de timinas na célula, essenciais para a reparação e replicação do DNA, seria expectável à partida que um alelo que levasse ao aumento da expressão do gene (3R) estivesse associado a uma diminuição do risco de desenvolver CCR. Esta hipótese teria lógica no sentido em que uma maior quantidade de timinas na célula permitiria que a incorporação de uracilo no DNA fosse menor e portanto levaria a uma maior estabilidade cromossómica. No entanto sabe-se que a expressão da *TYMS* é altamente regulada a nível do ciclo celular, tendo que seguir um padrão de aumento da expressão nas fases G1 e S, seguido de queda dos níveis de proteína após a fase S do ciclo (43, 44). Desta forma um alelo que aumente os níveis de expressão da proteína poderá facilitar o processo de aumento da expressão mas dificultará a diminuição rápida dos níveis de proteína que é necessário que ocorra para que o ciclo celular se complete de forma correcta. Alguns estudos mostram também que caso os níveis de *TYMS* se mantenham elevados na célula esta poderá ser estimulada a entrar em divisão, dado que a *TYMS* tem a



capacidade de inibir a tradução do mRNA do p53 (45, 46). Assim pode-se colocar a hipótese de o alelo 3R estar associado, embora de forma não estatisticamente significativa no nosso estudo, a um aumento do risco de CCR pois estará ligado a um estímulo da divisão celular. Outra hipótese para esta associação surge do facto de TYMS e MTHFR partilharem o mesmo substrato (5,10-MTHF). Maiores níveis de TYMS na célula levariam a que esta tivesse vantagem sobre a MTHFR na competição pelo substrato. Assim, a produção de dTMP seria favorecida em detrimento da produção de 5-MTHF, necessário para a conversão de homocisteína em metionina, afectando assim a metilação do DNA. Esta possível alteração da metilação do DNA poderia levar a uma desregulação da expressão génica da célula e, em ultima análise, a uma desregulação do ciclo celular.

A hipótese sugerida anteriormente é reforçada pelos resultados obtidos para o polimorfismo de deleção de 6pb na região 3'UTR do gene. Para este polimorfismo foi possível verificar que o alelo del se encontrava associado, de forma estatisticamente significativa, a um menor risco de CCR. Os indivíduos com o genótipo 6bp/del+del/del apresentam uma diminuição para menos de metade do risco de desenvolverem CCR quando comparados com os indivíduos com genótipo 6bp/6bp (OR=0,47; IC95%=0,30-0,72). Estes resultados aqui obtidos contrariam a maioria dos estudos realizados até ao momento sobre a influência deste polimorfismo em CCR. A maioria dos estudos não encontra qualquer tipo de associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento de CCR (36, 40). Uma das hipóteses para justificar este resultado é o facto de a maioria destes estudos se realizarem em populações distintas da analisada por nós, com um fundo genético distinto, o que poderá influenciar os resultados. Este é dos poucos estudos a avaliar estes polimorfismos na Europa e o único a fazê-lo numa população do Sul da Europa, com as consequentes diferenças a nível de fundo genético e de factores ambientais. Estes resultados seguem a linha dos resultados obtidos para o polimorfismo anterior. O polimorfismo de deleção afecta o nível de estabilidade e o tempo de semi-vida do mRNA da TYMS. O alelo del está associado a uma maior instabilidade do mRNA e portanto a uma menor semi-vida deste (47). Assim, indivíduos com este alelo terão uma menor expressão do gene. Desta forma os nossos resultados mostram que indivíduos com uma menor expressão do gene (6bp/del+del/del) têm um menor risco de desenvolver CCR. A hipótese para este resultado segue a mesma orientação do resultado anterior, uma maior expressão do gene TYMS poderá levar a uma desregulação a nível do ciclo celular, aumentando assim a probabilidade de surgirem células neoplásicas. Também como visto anteriormente, este aumento da expressão do gene poderá levar a uma menor capacidade de metilação do DNA, conduzindo a uma desregulação da expressão genica e consequentemente a uma maior probabilidade de haver instabilidade celular. Quando combinados os genótipos associados a uma menor expressão (2R/2R, 6pb/del+del/del) verificou-se uma redução superior do risco de desenvolver CCR, reforçando a associação entre os níveis de TYMS e o risco de CCR (OR=0,42; IC95%=0,29-0,73).

Para qualquer um dos polimorfismos estudados não foram encontradas interações com a ingestão dos nutrientes estudados, como forma de modelar o risco. A ingestão de folato, vitamina B6 e vitamina B12, parece não influenciar de forma directa o risco associado aos

polimorfismos da TYMS estudados. Tal poderá dever-se ao facto de a TYMS não estar dependente directamente de nenhuma destas vitaminas, embora dependa do consumo de folato como forma de fornecer os grupos metil necessários à conversão de dUMP em dTMP. Outra hipótese poderá resultar do facto de, com excepção do folato, a grande maioria dos indivíduos estudados apresenta uma ingestão diária destas vitaminas muito superior à dose diária recomendada, fazendo assim com que as variações entre indivíduos não reflectam necessariamente carências nutricionais suficientes para influenciar a modulação do risco de desenvolver CCR. Numa análise posterior foi possível observar uma interacção estatisticamente significativa entre o polimorfismo de deleção da TYMS e o polimorfismo C677T *MTHFR*. Indivíduos com um genótipo 6bp/6bp+TT tinham um risco aumentado em 4,5x (OR=4,5; IC95%=1,52-13,30). Este resultado demonstra que uma diminuição da actividade da enzima MTHFR associada a uma alta expressão da TYMS, leva a um aumento do risco, possivelmente por levar a que a produção de dTMP seja favorecida em relação à produção de 5-MTHF que levaria à produção de metionina e posteriormente à metilação do DNA.

Os resultados obtidos no terceiro estudo ajudaram a consolidar as hipóteses sugeridas anteriormente. Neste estudo foi investigada a expressão de 4 genes do ciclo do folato (*TYMS*, *MTR*, *MTHFR*, *SHMT1*) em biópsias de CCR. Neste estudo verificou-se uma sobreexpressão estatisticamente significativa dos genes *TYMS* e *MTR* em amostras tumorais quando comparadas com as amostras de tecido normal adjacente. Embora os outros dois genes estudados não apresentassem resultados estatisticamente significativos, verificou-se também uma tendência para sobreexpressão no gene *SHMT1*. Encontrou-se ainda uma relação directa entre os níveis de expressão dos genes *TYMS* e *MTR* ( $P<0,05$ ). Estes resultados podem ser associados a necessidade de uma rápida divisão por parte das células tumorais. As células para que a sua divisão possa ocorrer necessitam de ter disponível timidina obtida a partir da reacção metabolizada pela TYMS. Desta forma uma elevada expressão da TYMS será essencial para que as células tumorais tenham à sua disposição quantidade suficiente de timidina essencial para a sua rápida taxa de divisão. No entanto, olhando para o ciclo do folato e para os resultados, verificamos que nas células tumorais a enzima MTR necessita de ter uma elevada expressão. Este resultado poderia ser intrigante dado que um dos produtos resultantes da actividade da MTR é a metionina, essencial para a metilação de DNA. Como é sabido as células tumorais apresentam uma hipometilação generalizada do seu DNA, levando a crer numa baixa necessidade de metionina por parte destas células (48). No entanto este resultado pode ser explicado recordando que a TYMS para conseguir produzir timidilato necessita de efectuar uma transferência de um grupo metil para a dUMP. Este grupo metil, em última análise, terá a sua origem no folato ingerido na alimentação, que será posteriormente convertido em 5-MTHF, entrando assim no ciclo do folato. O 5-MTHF é substrato da enzima MTR sendo convertido em THF que será metabolizado em 5,10-MTHF (Substrato da TYMS) pela enzima SHMT1. Assim, para que a enzima TYMS tenha disponível uma grande quantidade de substrato, e necessário haver elevada actividade da enzima MTR de modo a que os grupos metil proveniente do folato cheguem à enzima TYMS. Caso não haja uma elevada expressão da enzima MTR o 5-MTHF

poderá ficar aprisionado, acabando mesmo por ser perdido pela célula, diminuindo assim a capacidade de produção de dTMP pela TYMS. Os nossos resultados vêm comprovar exactamente esta hipótese, mostrando a correlação entre a sobreexpressão do gene da TYMS e da MTR. Este estudo mostrou ainda a tendência para a sobreexpressão do gene da SHMT1, também ele essencial para este processo uma vez que é responsável pela conversão do THF em 5,10-MTHF. Deste modo, mostramos que o comportamento das células tumorais, a nível da regulação do ciclo do folato, actua no sentido de favorecer a actividade da enzima TYMS e consequentemente a produção de dTMP, sendo que para tal objectivo seja atingido também a expressão dos genes da MTR e SHMT1 seja aumentada, de modo a manter um fluxo de grupos metil provenientes da alimentação. É importante também referir o estudo da expressão dos transcritos alternativos do gene *TYMS* (*TYMS Δ23*; *TYMSΔ4*). Estes transcritos encontram-se mais expressos em células tumorais, sendo um deles exclusivo destas células (*TYMS Δ23*). Apenas um estudo anterior ao nosso havia analisado a expressão destes transcritos, tendo obtido resultados semelhantes (49). O papel destes transcritos nas células tumorais não é conhecido, sabendo-se apenas que ambos mantêm a grelha de tradução do transcrito original, deixando assim aberta a hipótese de poderem originar proteínas. No nosso estudo colocámos algumas hipóteses para o papel destes transcritos nas células tumorais. Mesmo que não dêem origem a proteínas, estes transcritos poderão participar na regulação da actividade celular. A TYMS possui um mecanismo de auto-regulação da sua tradução, em que a proteína se liga ao próprio mRNA impedindo a tradução do mesmo. Estes transcritos alternativos mantêm a sequência que permite a ligação das proteínas às regiões de inibição. Assim, nas células tumorais estes transcritos podem funcionar como alvos de inibição por parte das proteínas da TYMS permitindo que os transcritos completos fiquem livres, possibilitando assim às células continuar a aumentar os níveis de TYMS, contornando a sua auto-regulação.

Da investigação da relação entre os níveis de expressão e os polimorfismos determinou-se a associação entre o polimorfismo de deleção do gene *TYMS* e os níveis de expressão do mesmo. Verificou-se que o alelo del está associado a baixos níveis de expressão do gene *TYMS* em células tumorais. Este resultado reforça o facto de no estudo anterior termos encontrado um menor risco para desenvolver CCR para os indivíduos com o alelo del presente no seu genótipo. Não foi encontrada qualquer relação entre o polimorfismo de repetição de 28pb e os níveis de expressão. Este resultado pode ser explicado pelo facto de este polimorfismo afectar a expressão da TYMS ao nível da tradução, não tendo portanto implicações ao nível da produção de mRNA. Foi encontrada ainda uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo C1420T *SHMT1* e os níveis de expressão do gene. Os indivíduos com o alelo T apresentam níveis mais elevados de expressão do gene *SHMT1* em células tumorais. Tendo em consideração a hipótese por nós sugerida anteriormente, de que níveis elevados de SHMT1 são essenciais para as células tumorais fazerem circular os grupos metil, esta associação com o alelo T explica um resultado obtido num dos estudos anteriores onde se encontrou um aumento do risco de CCR para os indivíduos homozigóticos TT (OR.=2,6; IC95%=1,1-5,9) (14).

Não se encontrou qualquer associação entre os níveis de expressão ou polimorfismos dos vários genes estudados e os níveis de metilação do DNA nas células tumorais. Seria expectável que alterações nos genes investigados por nós, nomeadamente no gene *MTR*, provocassem alterações na metilação do DNA. O facto de não se ter encontrado qualquer associação poderá estar relacionado com o facto de a hipometilação do DNA ser um acontecimento relativamente precoce e com uma progressão exponencial no processo carcinogénico. Assim, ao analisarmos amostras tumorais em estadio avançado não é possível descortinar uma possível influência das alterações estudadas na metilação do DNA. O efeito destas alterações, caso exista, será mais facilmente identificado em lesões pré-neoplásicas, uma vez que estaremos a analisar o início do processo, observando as alterações susceptíveis de originar as células tumorais.

### ***Doença de Crohn***

Num estudo anterior, desenvolvido pelo nosso grupo de trabalho, havia sido identificado o baixo consumo de folato como factor de risco de desenvolvimento de DC (50). Desta forma foi decidido analisar o possível efeito do polimorfismo A2756G *MTR* no desenvolvimento de DC, assim como a sua interacção com factores nutricionais como a ingestão de folato, álcool e vitamina B12. Um dos primeiros resultados obtidos foi a associação entre o baixo consumo de folato e a apresentação de manifestações extra-intestinais da doença ( $P<0,05$ ). Algumas das manifestações extra-intestinais apresentadas pelos pacientes com DC são as doenças cardiovasculares e neurológicas. Apesar de para o caso das doenças neurológicas não haja ainda uma explicação satisfatória, para o caso das doenças cardiovasculares sabe-se que níveis elevados de homocisteína são considerados como factor de risco (51). Para além disso diversos estudos têm demonstrado a existência de homocisteína elevada em pacientes com DC (52, 53). Como vimos anteriormente, o folato está envolvido no metabolismo da homocisteína, na medida em que é convertido em 5-MTHF, o substrato necessário para que a enzima MTR metabolize a homocisteína em metionina (22). Assim, níveis baixos de folato implicarão níveis mais elevados de homocisteína, constituindo um risco de desenvolvimento de outras patologias associadas a DC. É sabido também que pacientes com DC têm uma maior probabilidade de virem a desenvolver CCR (54). Tal como vimos nos estudos anteriores, também para o CCR o baixo consumo de folato é um factor de risco, estabelecendo assim, o ciclo do folato como uma ponte entre o desenvolvimento destas duas patologias.

O estudo do polimorfismo A2756G *MTR* revelou a existência de uma associação entre o alelo G e o desenvolvimento de DC (indivíduos AG: OR=5,1; IC95%=2,2-12,0; indivíduos GG: OR=16,5; IC95%=2,3-120,7), sendo esta a primeira vez que tal associação é encontrada. Verificou-se ainda que todos os indivíduos que apresentavam história familiar de DC aparentavam um genótipo com o alelo G presente. Tal como discutido anteriormente o papel deste polimorfismo não está completamente esclarecido, embora alguns estudos associem o alelo G a uma menor capacidade de metabolização da enzima e portanto a uma maior acumulação de homocisteína.

Desta forma a homocisteína parece estar envolvida, de algum modo, não só no aparecimento de manifestações extra-intestinais, mas também no surgimento da própria doença. Alguns autores sugerem que a homocisteína acumulada nas células irá provocar alterações nas proteínas, originando assim novos antígenos que desencadearão uma resposta auto-imune (55). Esta resposta auto-imune poderá estar na base do surgimento e desenvolvimento da DC, justificando o facto de este polimorfismo e do baixo consumo de folato estarem associados ao desenvolvimento da doença. Foi ainda verificado que o alelo G do polimorfismo se encontrava associado a uma idade de diagnóstico da doença mais baixa (AG+GG: 26,3±9,6 anos; AA: 32,4±12,1 anos;  $P<0,05$ ). Um estudo recente numa população portuguesa demonstra haver um aumento da homocisteína nos pacientes com idade mais baixa (56), reforçando assim as conclusões por nós retiradas do nosso estudo, o alelo G estará relacionado com um aumento da homocisteína, levando a um surgimento mais precoce da doença e portanto a uma idade de diagnóstico mais baixa. O polimorfismo A2756G desempenha assim um papel preponderante como factor de diagnóstico da DC, tendo sido associado pela primeira vez a esta patologia.

## **II. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O cancro, em particular o cancro colo-rectal, é uma patologia que continua a ter uma elevada taxa de mortalidade em todo o Mundo, apesar de todo o esforço de investigação feito nos finais do século passado e início deste. Com a sequenciação do genoma humano a hipótese do diagnóstico genético surgiu para inúmeras patologias, entre elas o CCR. No entanto, com o avançar do conhecimento percebeu-se que esse objectivo seria difícil de atingir, em particular para patologias com uma etiologia complexa e multifactorial, como o caso do CCR. A contribuição de múltiplos genes para esta patologia veio trazer um grau de complexidade elevado à sua investigação. Poucos são os genes de penetrância completa que estão na origem desta doença; a maioria dos genes tem penetrância incompleta, sendo que a maioria deles continua por identificar como factores de susceptibilidade. Desta forma, a investigação de genes que contribuam para a predisposição do desenvolvimento de CCR é essencial de forma a melhor entender os mecanismos na base desta patologia. Estes factores genéticos podem no entanto ser modulados por factores ambientais tais como a nutrição. Os factores nutricionais têm captado nos últimos anos a atenção dos investigadores, da indústria e do público em geral enquanto factores promotores ou protectores de determinadas patologias. Do juntar destes dois mundos surgiu o conceito de Nutrigenética: factores genéticos e nutricionais em interacção no aparecimento e desenvolvimento das patologias.

O estudo do ciclo do folato, enquanto via metabólica onde se encontram em interacção factores genéticos e nutricionais, surge assim como um objectivo essencial para um melhor conhecimento das origens e desenvolvimento do CCR e DC.

Este trabalho ao investigar os genes *MTR* e *TYMS* abrangeu dois dos processos metabólicos mais relevantes da célula a nível genético: metilação e replicação do DNA. Os nossos resultados

permitiram estabelecer um factor de protecção para o desenvolvimento de CCR (alelo del polimorfismo de deleção de 6pb da TYMS) numa população portuguesa. Foi-nos possível verificar que estes factores de susceptibilidade ou protecção podem ser modulados pela existência de outros polimorfismos no mesmo gene ou em genes diferentes do ciclo do folato (*MTHFR*, por exemplo) e por factores nutricionais, como no caso dos níveis de ingestão de folato. A perspectiva global da expressão dos genes veio reforçar a ideia de que uma regulação complexa e que envolve vários genes do ciclo do folato permite que as células evitem o processo oncogénico. Um equilíbrio entre o fluxo de grupos metil para o processo de metilação e para o processo de síntese de dTMP é essencial para o bom funcionamento celular. Mais do que cada factor individualmente, apenas o estudo global dos vários polimorfismos nos diferentes genes, níveis de substrato e cofactores permitirão estabelecer os mecanismos na base do aparecimento de patologias como CCR e DC. Este trabalho conseguiu alcançar algum conhecimento sobre este equilíbrio, nomeadamente entre o funcionamento de *MTR* e *TYMS* enquanto genes fundamentais no ciclo do folato. Com este estudo foi possível compreender um pouco melhor as mudanças na regulação dos genes do ciclo do folato em células tumorais, e o modo como isso lhes permitirá manter o seu ciclo de vida com elevada taxa de proliferação.

No que se refere à DC este trabalho permitiu identificar pela primeira vez um factor de diagnóstico desta patologia envolvendo o gene *MTR* (polimorfismo A2756G). Esta descoberta veio trazer uma importância acrescida ao papel do ciclo do folato nas doenças inflamatórias do intestino, pondo cada vez mais em evidência o papel da homocisteína nestas patologias. A importância da homocisteína poderá ser também extensível ao CCR, levando assim a que possamos definir que no ciclo do folato os principais processos metabólicos a serem considerados são: a síntese de dTMP, a metilação do DNA e a metabolização da homocisteína. Com o nosso estudo pensamos ter contribuído para um melhor entendimento do papel do ciclo do folato no desenvolvimento de CCR e DC, sendo um ponto de partida para futuras investigações que possa revelar cada vez melhor as complexas interações metabólicas desta via e a sua influência nas patologias estudadas. Acreditamos que no futuro estes estudos permitirão que o estudo do ciclo do folato tenha cada vez mais uma relevância fundamental a nível de diagnóstico e terapêutica destas patologias.

Algumas sugestões para alguns destes futuros estudos poderão ser:

- Investigação da possível tradução dos transcritos alternativos da TYMS e actividade metabólica das enzimas por eles produzidas, caso existam. Isto permitiria trazer um melhor entendimento do seu papel nas células tumorais e possíveis implicações a nível terapêutico que possam acarretar.
- Relação dos polimorfismos da TYMS com a inibição da tradução dos mRNA dos genes *p53* e *c-myc*. Os polimorfismos estudados mostram influenciar os níveis de TYMS. Dado se saber que a enzima pode inibir a tradução destes genes, seria importante esclarecer se alguns dos efeitos observados para estes polimorfismos estão relacionados com a inibição do *p53* e *c-myc*.

- Mapeamento da expressão, quer a nível da transcrição quer a nível da tradução, de todos os genes do ciclo do folato em células tumorais. Com este estudo poderíamos melhor esclarecer o modo como o fluxo dos grupos metil ocorre a nível das células tumorais.
- Avaliar o efeito da inibição simultânea da MTR e da TYMS na progressão dos tumores em pacientes com CCR. Perceber se a interrupção simultânea da actividade destas duas enzimas teria efeitos benéficos nos pacientes, e sua potencial aplicação terapêutica.
- Avaliação da função do polimorfismo A2756G *MTR* na capacidade de metabolização da enzima. Esclarecer o efeito deste polimorfismo no funcionamento do gene.
- Avaliação dos níveis de homocisteína em função dos diferentes polimorfismos dos genes do ciclo do folato. Este trabalho iria permitir avaliar a hipótese levantada acerca do efeito do aumento da homocisteína em função dos polimorfismos.
- Avaliação dos polimorfismos da TYMS em pacientes com DC. Com este estudo iríamos perceber qual o efeito de uma alteração do fluxo dos grupos metil na susceptibilidade para DC.

### **III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature genetics*. 2008;40(6):695-701.
2. Polychronakos C. Common and rare alleles as causes of complex phenotypes. *Current atherosclerosis reports*. 2008;10(3):194-200.
3. Olsen J, Overvad K. The concept of multifactorial etiology of cancer. *Pharmacology & toxicology*. 1993;72 Suppl 1:33-8.
4. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES, et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*. 2011;4(2):69-89.
5. Kang JX. The coming of age of nutrigenetics and nutrigenomics. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*. 2012;5(1):I-II.
6. Fowler B. The folate cycle and disease in humans. *Kidney international Supplement*. 2001;78:S221-9.
7. Loktionov A. Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases (review). *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003;14(8):426-51.
8. Riscuta G, Dumitrescu RG. Nutrigenomics: implications for breast and colon cancer prevention. *Methods Mol Biol*. 2012;863:343-58.
9. Magalhaes B, Bastos J, Lunet N. Dietary patterns and colorectal cancer: a case-control study from Portugal. *Eur J Cancer Prev*. 2011;20(5):389-95.
10. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Marques Vidal P, Camilo ME. Nutritional risks and colorectal cancer in a Portuguese population. *Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*. 2005;20(3):165-72.
11. Amaral T, de Almeida MD, Barros H. Diet and colorectal cancer in Portugal. *IARC scientific publications*. 2002;156:549-52.
12. Guerreiro CS, Cravo ML, Brito M, Vidal PM, Fidalgo PO, Leitao CN. The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(6):1592-7.
13. Xavier CP, Lima CF, Preto A, Seruca R, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer letters*. 2009;281(2):162-70.
14. Guerreiro CS, Carmona B, Goncalves S, Carolino E, Fidalgo P, Brito M, et al. Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in



- Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. The American journal of clinical nutrition. 2008;88(5):1413-8.
15. Kennedy DA, Stern SJ, Moretti M, Matok I, Sarkar M, Nickel C, et al. Folate intake and the risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Cancer epidemiology. 2011;35(1):2-10.
  16. Luebeck EG, Moolgavkar SH, Liu AY, Boynton A, Ulrich CM. Does folic acid supplementation prevent or promote colorectal cancer? Results from model-based predictions. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2008;17(6):1360-7.
  17. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G, et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2007;16(7):1325-9.
  18. Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. Journal of inherited metabolic disease. 2011;34(1):101-9.
  19. Williams EA. Folate, colorectal cancer and the involvement of DNA methylation. The Proceedings of the Nutrition Society. 2012;71(4):592-7.
  20. Patai AV, Molnar B, Kalmar A, Scholler A, Toth K, Tulassay Z. Role of DNA methylation in colorectal carcinogenesis. Dig Dis. 2012;30(3):310-5.
  21. Fenech M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. Mutation research. 2012;733(1-2):21-33.
  22. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. The Journal of biological chemistry. 1997;272(6):3628-34.
  23. Rader JI. Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. The Journal of nutrition. 2002;132(8 Suppl):2466S-70S.
  24. Miller JW, Beresford SA, Neuhaus ML, Cheng TY, Song X, Brown EC, et al. Homocysteine, cysteine, and risk of incident colorectal cancer in the Women's Health Initiative observational cohort. The American journal of clinical nutrition. 2013;97(4):827-34.
  25. Akoglu B, Milovic V, Caspary WF, Faust D. Hyperproliferation of homocysteine-treated colon cancer cells is reversed by folate and 5-methyltetrahydrofolate. European journal of nutrition. 2004;43(2):93-9.
  26. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the

- American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 1999;8(9):825-9.
27. Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer causes & control : CCC*. 2002;13(3):239-48.
  28. Goode EL, Potter JD, Bigler J, Ulrich CM. Methionine synthase D919G polymorphism, folate metabolism, and colorectal adenoma risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2004;13(1):157-62.
  29. Zhou D, Mei Q, Luo H, Tang B, Yu P. The polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase, methionine synthase reductase, and the risk of colorectal cancer. *International journal of biological sciences*. 2012;8(6):819-30.
  30. Yoshimitsu S, Morita M, Hamachi T, Tabata S, Abe H, Tajima O, et al. Methionine synthase and thymidylate synthase gene polymorphisms and colorectal adenoma risk: the self defense forces study. *Molecular carcinogenesis*. 2012;51 Suppl 1:E151-7.
  31. Guimaraes JL, Ayrizono Mde L, Coy CS, Lima CS. Gene polymorphisms involved in folate and methionine metabolism and increased risk of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2011;32(5):853-61.
  32. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer research*. 2002;62(15):4519-24.
  33. Naushad SM, Jain Jamal MN, Prasad CK, Rama Devi AR. Relationship between methionine synthase, methionine synthase reductase genetic polymorphisms and deep vein thrombosis among South Indians. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2008;46(1):73-9.
  34. Jiang Y, Xia X, Wang W, Lin L, Xu C, Cai Z, et al. Hyperhomocysteinemia and related genetic polymorphisms correlate with ulcerative colitis in Chinese Han population in Central China [corrected]. *Cell biochemistry and biophysics*. 2012;62(1):203-10.
  35. Jhee KH, Kruger WD. The role of cystathionine beta-synthase in homocysteine metabolism. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(5-6):813-22.
  36. Ulrich CM, Curtin K, Potter JD, Bigler J, Caan B, Slattery ML. Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(11 Pt 1):2509-16.

37. Steck SE, Keku T, Butler LM, Galanko J, Massa B, Millikan RC, et al. Polymorphisms in methionine synthase, methionine synthase reductase and serine hydroxymethyltransferase, folate and alcohol intake, and colon cancer risk. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*. 2008;1(4):196-204.
38. Carmona B, Guerreiro C, Cravo M, Nobre-Leitao C, Brito M. 5' and 3' UTR thymidylate synthase polymorphisms modulate the risk of colorectal cancer independently of the intake of methyl group donors. *Molecular medicine reports*. 2008;1(5):747-52.
39. Lu M, Sun L, Yang J, Li YY. 3R variant of thymidylate synthase 5'-untranslated enhanced region contributes to colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(6):2605-10.
40. Gao CM, Ding JH, Li SP, Liu YT, Cao HX, Wu JZ, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase gene and risk of colorectal cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(8):4087-91.
41. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell structure and function*. 1995;20(3):191-7.
42. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(12):4096-101.
43. Feder JN, Guidos CJ, Kusler B, Carswell C, Lewis D, Schimke RT. A cell cycle analysis of growth-related genes expressed during T lymphocyte maturation. *The Journal of cell biology*. 1990;111(6 Pt 1):2693-701.
44. Storms RK, Ord RW, Greenwood MT, Mirdamadi B, Chu FK, Belfort M. Cell cycle-dependent expression of thymidylate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 1984;4(12):2858-64.
45. Chu E, Allegra CJ. The role of thymidylate synthase as an RNA binding protein. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1996;18(3):191-8.
46. Ju J, Pedersen-Lane J, Maley F, Chu E. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(7):3769-74.
47. Pullmann R, Jr., Abdelmohsen K, Lal A, Martindale JL, Ladner RD, Gorospe M. Differential stability of thymidylate synthase 3'-untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(33):23456-63.
48. Akhavan-Niaki H, Samadani AA. DNA Methylation and Cancer Development: Molecular Mechanism. *Cell biochemistry and biophysics*. 2013.

49. Hisatomi H, Tanemura H, Iizuka T, Katsumata K, Nagao K, Sumida H, et al. Differential alternative splicing expressions of thymidylate synthase isoforms. *Cancer letters*. 2003;193(2):127-31.
50. Sousa Guerreiro C, Cravo M, Costa AR, Miranda A, Tavares L, Moura-Santos P, et al. A comprehensive approach to evaluate nutritional status in Crohn's patients in the era of biologic therapy: a case-control study. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102(11):2551-6.
51. Huang T, Yuan G, Zhang Z, Zou Z, Li D. Cardiovascular pathogenesis in hyperhomocysteinemia. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2008;17(1):8-16.
52. Nakano E, Taylor CJ, Chada L, McGaw J, Powers HJ. Hyperhomocysteinemia in children with inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2003;37(5):586-90.
53. Peyrin-Biroulet L, Rodriguez-Gueant RM, Chamaillard M, Desreumaux P, Xia B, Bronowicki JP, et al. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease: revisiting the role of homocysteine. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102(5):1108-15.
54. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Cancer risks in Crohn disease patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2009;20(3):574-80.
55. Lazzerini PE, Capecchi PL, Selvi E, Lorenzini S, Bisogno S, Galeazzi M, et al. Hyperhomocysteinemia, inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2007;6(7):503-9.
56. Magalhães J, Rosa B, Moreira M, Barbosa M, Rebelo A, Leite S, et al. Factors associated with hyperhomocysteinemia in Portuguese patients with inflammatory bowel disease. 2013.

## **ANEXOS**

---





## Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients<sup>1-3</sup>

Catarina Sousa Guerreiro, Bruno Carmona, Susana Gonçalves, Elisabete Carolino, Paulo Fidalgo, Miguel Brito, Carlos Nobre Leitão, and Marília Cravo

### ABSTRACT

**Background:** Polymorphisms located in genes involved in the metabolism of folate and some methyl-related nutrients are implicated in colorectal cancer (CRC).

**Objective:** We evaluated the association of 3 genetic polymorphisms [C677T *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase), A2756G *MTR* (methionine synthase), and C1420T *SHMT* (serine hydroxymethyltransferase)] with the intake of methyl-donor nutrients in CRC risk.

**Design:** Patients with CRC ( $n = 196$ ) and healthy controls ( $n = 200$ ) matched for age and sex were evaluated for intake of methyl-donor nutrients and the 3 polymorphisms.

**Results:** Except for folate intake, which was significantly lower in patients ( $P = 0.02$ ), no differences were observed in the dietary intake of other methyl-donor nutrients between groups. High intake of folate ( $>406.7 \mu\text{g/d}$ ) was associated with a significantly lower risk of CRC (odds ratio: 0.67; 95% CI: 0.45, 0.99). The A2756G *MTR* polymorphism was not associated with the risk of developing CRC. In contrast, homozygosity for the C677T *MTHFR* variant (TT) presented a 3.0-fold increased risk of CRC (95% CI: 1.3, 6.7). Similarly, homozygosity for the C1420T *SHMT* polymorphism also had a 2.6-fold increased risk (95% CI: 1.1, 5.9) of developing CRC. When interactions between variables were studied, low intake of all methyl-donor nutrients was associated with an increased risk of CRC in homozygous participants for the C677T *MTHFR* polymorphism, but a statistically significant interaction was only observed for folate (odds ratio: 14.0; 95% CI: 1.8, 108.5). No significant associations were seen for *MTR* or *SHMT* polymorphisms.

**Conclusion:** These results show an association between the C677T *MTHFR* variant and different folate intakes on risk of CRC. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1413–8.

### INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is a complex disease that involves multiple genetic and nutritional factors (1). Among the latter, folate was shown to play a preventive role in colorectal carcinogenesis probably because of its involvement in the processes of DNA methylation and synthesis (2). Other nutrients such as methionine, vitamin B-6, and vitamin B-12, which interact metabolically with folate in this process, may also influence the risk of CRC (3). In some of those studies the observed inverse association between folate status and CRC risk was further modified by genetic polymorphisms of the enzymes involved in folate

metabolism, most notably methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). A common C677T substitution in the *MTHFR* gene, converting alanine to valine, results in a thermolabile enzyme with decreased activity (4). Numerous studies have shown that this variant (TT) is associated to a decreased risk of CRC, but only when folate status is normal or high. As stated by Crott and Mason (4), *MTHFR* polymorphism is possibly the only known gene polymorphism that switches from being a risk factor to a protective one depending on nutrient status. In addition, because folate metabolism involves the interconversion of different coenzymatic forms of the vitamin through multiple cycles, as well as feedback mechanisms between cycles, it is also important to evaluate the joint influence that other polymorphisms in genes involved in these cycles might exert. Methionine synthase requires vitamin B-12, as methylcobalamin, as a cofactor. A variant in this gene was described, A2756G, which results in the substitution of aspartate by glycine. Studies on colorectal neoplasia are inconsistent, with some studies showing that GG genotype is associated to a decreased risk of CRC (5, 6), yet a possible increased risk of colorectal adenoma (7). No associations with diet were sought in those previous studies. Serine hydroxymethyltransferase (*SHMT*) is a pyridoxal phosphate (B6)-dependent enzyme. A polymorphism was identified, C1420T, which results in the substitution of the amino acid leucine by phenylalanine. The functional significance of this polymorphism is still unknown. A single study has examined the influence that this polymorphism might have in the risk of CRC and found no association. Again, no associations with dietary intake were examined (8). Therefore, it was the aim of this case-control study to evaluate the role of these polymorphisms in

<sup>1</sup> From the Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Unidade de Nutrição e Metabolismo do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal (CSG); the Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa, Portugal (BC, SG, EC, and MB); and the Serviço de Gastroenterologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE, Lisboa, Portugal (PF, CNL, and MC).

<sup>2</sup> Supported by the Fundação Calouste Gulbenkian (grant 68925/2005-20)

<sup>3</sup> Reprints not available. Address correspondence to CS Guerreiro, Área Científica de Dietética, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Av. D. João II, Lote 4.69.01 1990-096 Lisboa, Portugal. E-mail: catarina.guerreiro@estesl.ipl.pt

Received January 15, 2008. Accepted for publication August 1, 2008.  
doi: 10.3945/ajcn.2008.25877.



defining CRC risk either alone or in association with specific nutrient intakes and other genotypes.

## SUBJECTS AND METHODS

### Study population

Study participants were described previously (9). Briefly this was a case-control study, performed at the Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil EPE. The study was approved by the Scientific and Ethics committees of the Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil EPE, and both patients and controls gave their informed written consent to participate in the study.

The patients' group is composed of 196 subjects [104 men, 92 women; age ( $\bar{x} \pm SD$ ):  $64.2 \pm 11.3$  y] with a histologic diagnosis of CRC, whereas the control group included 200 healthy blood donors volunteers recruited from the same institute, with a similar sex and age distribution (106 men, 94 women; mean age:  $62.2 \pm 12.1$  y) and with no previous history of cancer at any site. Colonoscopy was not performed in controls to exclude CRC, but all subjects were symptom free, and no anemia was present. One hundred sixty-nine (86.5%) of 196 patients had a recent diagnosis of CRC, whereas the remaining 27 (13.5%) were being treated for a disease relapse. For previous therapies, 119 (60.7%) of 196 patients had not received any form of treatment, 28 (14.3%) had already undergone surgery, 13 (6.6%) had received pelvic radiotherapy, 11 (5.6%) had received  $\geq 1$  cycles of chemotherapy, and the remaining 25 (12.8%) had undergone combined forms of treatment. Tumor-node-metastasis staging was as follows: stage I, 24 (13.5%) of 178; stage II, 64 (35.9%) of 178; stage III, 53 (29.8%) of 178; and stage IV, 37 (20.8%) of 178.

### Nutritional intake evaluation

For quantifying folate, vitamin B-6, vitamin B-12, glycine, methionine, serine, and alcohol intake, we used a food-frequency questionnaire (10), validated for the Portuguese population. Participants were asked to recall their habits in the year before CRC diagnosis in patients or in the year before interview in controls. Colored photographs of most food items, showing 3 different portions sizes, as well as measuring cups and spoons, were used to facilitate quantification of intake. Type and quantity of food intake was then analyzed in a modified database FOOD PROCESSOR SOFTWARE, version 7 (ESHA Research Inc, Salem, OR), including some Portuguese food items, which allows the quantification of different macronutrients and micronutrients. Nutrient values were calculated from foods and supplements (11 of 196 patients and none of the controls were taking supplements). Physical activity in the year before cancer diagnosis in patients or in the year before interview in controls was assessed with the use of Jackson's questionnaire (11), which categorized subjects in 3 different levels: low (0), intermediate (1), and high (2). Smoking habits were recorded as the number of cigarettes per day.

### Genotype data

Whole blood samples were collected and stored in 3-mm Cards Kit papers. DNA extraction was done with the use of

Generation Capture Card Kit, DNA Purification, DNA Elution (Gentra Systems Inc, Minneapolis, MN). The GAC/GTC polymorphism at codon 677 of the *MTHFR* gene and the A2756G polymorphism from *MTR* (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase) were genotyped with the use of an "Assays-by-Design" TaqMan allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA). The *SHMT* polymorphism C1420T was genotyped with the use of TaqMan probes designed with BEACON DESIGNER 5.0 software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). Probes for the C allele (CAGAGGGAAGAGAGAGGCGAAGC) and T allele (CAGAGGGAAGAAAGAGGCGAAGC) and for the forward primer (GAAAGAGTTCAAGGAGAGACT) and the reverse primer (CTCCTTTAGAAGTCAGGCAG) were used. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with mixes consisting of 4  $\mu$ L of genomic DNA, 10  $\mu$ L of Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu$ L of 20 $\times$  assay mix, and ddH<sub>2</sub>O  $\leq 20$   $\mu$ L of final volume. The following amplification protocol was used: denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 92  $^{\circ}$ C for 15 s, and annealing and extension at 60  $^{\circ}$ C for 1 min. All the reactions were performed in the iCycler iQ Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). After PCR, the genotype of each sample was attributed automatically by measuring the allelic-specific fluorescence on the equipment software.

Subjects were classified as homozygous for the variant if they carried 2 mutated alleles, heterozygous if they carried only 1 mutated allele, and finally homozygous for the wild type when they had no mutant alleles. When analyzing the interaction between genetic and nutritional variables, the median value for each nutrient was considered. We did not use the dietary reference intake because, for most nutrients, the percentage of subjects who ingested the dietary reference intake was higher than 80%, for both patients and controls.

### Statistical methods

Statistical analysis was performed with the use of SPSS version 15.0 for WINDOWS (SPSS Inc, Chicago, IL). Data were expressed as mean  $\pm$  SD, as number of subjects and (percentage), or as odds ratio (OR) and 95% CI. Bivariate analyses were conducted with the use of the Student's *t* test or Mann-Whitney test for continuous and the chi-square test for categorical variables. Multiple logistic regression was used to assess the variables related to CRC risk. Significance of interactions was assessed with the likelihood ratio test comparing the model with interaction with one containing only the main effects for 2 variables. Statistical significance was established at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Subjects characteristics and lifestyle habits

Both groups were similar for age and sex distribution. Some patients (23%) had a positive familial history of CRC in first- or second-degree relatives, contrasting with only 8% of the control population ( $P < 0.001$ ; OR: 3.4; 95% CI: 1.85, 6.29). No differences were found in smoking habits between the groups ( $P > 0.05$ ), but compared with controls, patients had a significantly lower body mass index (in kg/m<sup>2</sup>:  $27.0 \pm 3.9$  compared with  $25.6 \pm 4.2$ ;  $P = 0.01$ ) and were significantly less active ( $P = 0.001$ ). However, exercise per se did not influence the risk of developing CRC (OR: 0.78; 95% CI: 0.53, 1.1).





**Nutritional intake evaluation**

The daily nutritional intake of folate, vitamins B-12 and B-6, glycine, methionine, serine, and alcohol is shown in Table 1. No significant differences were observed between cases and controls except for folate intake that was significantly lower in patients ( $P = 0.02$ ). Analyzing the risk associated with this nutrient intake, we observed a risk (OR) of 0.67 (95% CI: 0.45, 0.99) for participants with a high intake of folate ( $>406.7 \mu\text{g/d}$ ). Alcohol consumption was higher in patients, but the difference did not reach statistical significance, because 35.2% of the patients and 38.5% of the controls did not drink any type of alcoholic beverage. However, if we consider only alcohol drinkers in both groups, we observed that daily intake was significantly higher in patients than in controls: 38.8 g/d compared with 31.0 g/d, respectively (OR: 1.97; 95% CI: 1.19, 3.26). When analyzing the concomitant influence of  $\geq 2$  nutrients in modulating the risk of CRC, no interaction between variables was found, except for a high alcohol intake combined with low folate ingestion, which was associated, to a statistically marginal degree, with a higher risk of developing CRC (OR: 1.47; 95% CI: 0.94, 2.30;  $P = 0.08$ ).

**Polymorphism genotypes**

The genotype frequencies for polymorphisms are reported in Table 2. Genotype distributions among controls were in agreement with the Hardy Weinberg equilibrium with the exception of the C677T *MTHFR* polymorphism. The variant allele frequencies for C677T *MTHFR*, A2756G *MTR*, and C1420T *SHMT* genotypes were 31.2%, 16.7%, and 26.5%, respectively, in controls, and 32.7%, 15.1%, and 28.6%, respectively, in cases. A2756G *MTR* per se was not associated with increased risk of CRC (Table 2). In contrast, homozygous participants for the C677T *MTHFR* variant (TT) showed a 3.0-fold increased risk of CRC (OR: 3.01; 95% CI: 1.3, 6.7). Similarly, homozygosity for the C1420T *SHMT* polymorphism had a 2.6-fold increased risk (95% CI: 1.1, 5.9) of developing CRC. None of the variant alleles of the 3 polymorphisms was associated with the risk of CRC.

Considering only the patient group, we did not observe any correlation between genotype and sex, tumor location (colon or rectum), stage of disease, or familial history of CRC. We also evaluated the interaction between the 3 polymorphisms in modulating the risk of CRC. For each sex no significant interaction was observed between the different genotypes (data not shown).

**Diet and polymorphisms interaction**

The interaction between the intake of several methyl-donor nutrients and alcohol and the C677T *MTHFR* polymorphism is shown in Table 3. Interestingly, we observed that a low intake of all methyl-donor nutrients was associated with increased risk of developing CRC in TT carriers, but a significant interaction was only observed for folate (OR: 14.0; 95% CI: 1.8, 108.5). For alcohol intake no modulating effect was observed. For the A2756G *MTR* and C1420T *SHMT* polymorphisms, no significant interactions were observed with any of the nutrients studied.

**DISCUSSION**

The present case-control study focused on the risk of CRC and the interaction between intake of folate and other methyl-related nutrients and genetic polymorphisms in folate-metabolizing enzymes in a Portuguese population. A number of epidemiologic, clinical, and animal studies performed during the past 2 decades strongly support the concept that low folate status predisposes to colorectal carcinogenesis (12). Biological mechanisms linking folate depletion to colorectal carcinogenesis include disruption of nucleotide synthesis, DNA methylation, or both because folate is the primary intermediary for most methylation reactions in cellular metabolism (2, 12–15).

Although most studies focus on folate alone, there are other nutrients, such as vitamin B-6 or vitamin B-12, which are important coenzymes required for the activity of different enzymes involved in these methylation cycles such as MTR or SHMT, or certain essential and nonessential amino acids that also play important functions in the DNA methylation cycle. For these reasons, in the present study, we evaluated the influence of these methyl-related nutrients either alone or in interaction with the folate-metabolizing enzymes MTHFR, MTR, and SHMT in the risk of CRC.

Our data show that, except for folate, none of the other nutrients that we analyzed alone or in conjunction with others influenced the risk of CRC. For folate, we observed that an intake of folate  $> 406.7 \mu\text{g/d}$  reduced the risk of CRC in  $>30\%$  (OR: 0.67; 95% CI: 0.45, 0.99). This is in agreement with most prospective epidemiologic studies published so far (16, 17), although recently published studies raise the hypothesis whether a high folate intake in patients harboring premalignant lesions, ie, colorectal adenomas, might actually increase the risk of CRC (7, 18).

**TABLE 1**  
Daily nutritional intake of participants<sup>1</sup>

	Cases (n = 196)	Controls (n = 200)	P	OR (95% CI) <sup>2</sup>
Vitamin B-6 (mg/d)	2.83 $\pm$ 1.06 <sup>3</sup>	2.85 $\pm$ 0.98	NS	0.77 (0.50, 1.14)
Vitamin B-12 ( $\mu\text{g/d}$ )	14.5 $\pm$ 9.1	14.3 $\pm$ 8.23	NS	0.98 (0.66, 1.45)
Folate ( $\mu\text{g/d}$ )	401.6 $\pm$ 161.9	434.3 $\pm$ 161.3	0.02	0.67 (0.45, 0.99)
Glycine (mg/d)	5.39 $\pm$ 2.8	5.10 $\pm$ 2.34	NS	1.00 (0.68, 1.50)
Methionine (mg/d)	2.85 $\pm$ 1.28	2.78 $\pm$ 1.13	NS	0.99 (0.67, 1.50)
Serine (mg/d)	5.15 $\pm$ 2.20	5.14 $\pm$ 1.95	NS	0.89 (0.59, 1.30)
Alcohol (g/d)	25.17 $\pm$ 39.8	19.14 $\pm$ 43.42	NS	1.08 (0.73, 1.61)

<sup>1</sup> Differences in nutrients were determined with the Mann-Whitney test, adjusted for age, sex, and colorectal cancer history. OR, odds ratio.

<sup>2</sup> OR was determined with the values above or below the nutrient median intake. The cutoffs were as follows: vitamin B-6, 12.5 mg; vitamin B-12, 12.5  $\mu\text{g}$ ; folate, 406.7  $\mu\text{g}$ ; methionine, 2.58 mg; serine, 4.86 mg; glycine 4.68 mg; and alcohol, 3.4 g/d.

<sup>3</sup>  $\bar{x} \pm \text{SD}$  (all such values).



TABLE 2

Genotypes frequencies and associations with colorectal cancer risk<sup>1</sup>

	Cases (n = 196)	Controls (n = 200)	P <sup>2</sup>	OR (95% CI) <sup>3</sup>
	% (n)	% (n)		
<b>MTHFR</b>				
CC/CT	86.7 (170)	95.5 (191)	0.002	1
TT	13.3 (26)	4.5 (9)		3.01 (1.3, 6.7)
Allele C	67.3 (264)	68.8 (275)	NS	1
Allele T	32.7 (128)	31.2 (125)		1.07 (0.79, 1.44)
<b>MTR</b>				
AA/AG	98.0 (192)	98.0 (196)	NS	1
GG	2.0 (4)	20.0 (4)		0.77 (0.18, 3.3)
Allele A	84.8 (333)	84.9 (339)	NS	1
Allele G	15.1 (59)	16.7 (67)		0.90 (0.61, 1.32)
<b>SHMT</b>				
CC/CT	90.0 (177)	95.5 (191)	0.04	1
TT	10.0 (19)	4.5 (9)		2.6 (1.1, 5.9)
Allele C	71.4 (280)	73.5 (294)	NS	1
Allele T	28.6 (112)	26.5 (106)		1.11 (0.81, 1.52)

<sup>1</sup> MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase; MTR, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; OR, odds ratio.

<sup>2</sup> Determined with the chi-square test.

<sup>3</sup> Wild-type-heterozygote genotype was the reference category for OR calculation (multiple regression). OR was adjusted for age, sex, and colorectal cancer history.

However, we would like to strengthen that this increased risk of CRC is observed when pharmacologic doses of folic acid (the synthetic form of folate with greater availability) is used and not with dietary folate intake alone. In regard to the influence that genetic polymorphisms exert in the risk of CRC, the polymorphism C677T of the *MTHFR* gene is probably the most studied, but its relation with the risk of CRC is still unclear. The presence of this polymorphic variant (TT) was shown to reduce in vitro the enzyme activity to 30% (19), which may result in a significantly lower DNA methylation in TT carriers than in CC and CT subjects (20).

Contrary to most previously published studies, which report a 50% reduction in CRC risk in persons carrying the TT genotype, we report that the TT genotype was associated with an increased risk of CRC (OR: 3.01; 95% CI: 1.3, 6.7). However, a critical examination of previously published studies suggests that the protective effect of the TT genotype seems to largely depend on folate intake. Thus, among the first studies performed in Northern American countries, Chen et al (21) found that the TT genotype could actually increase the risk of CRC in men with high alcohol consumption (OR: 1.56; 95% CI: 0.65, 3.81). Alcohol is a known antagonist of folate metabolism and similarly to folate depletion; chronic alcohol abuse was shown to result in DNA hypomethylation (22). In a later study, Ma et al (23) showed that the TT genotype exhibited a protective effect in the risk of CRC but only in patients with a high folate intake. In men with low folate intake, the TT genotype was actually associated with an increased risk of developing CRC (OR: 1.33; 95% CI: 0.34, 5.17). Note that all the studies performed in North America since then (which unequivocally show a protective effect of the TT genotype) were performed after the mandatory fortification of enriched uncooked cereal grains with folic acid. Finally, we also have to consider that ≤35–50% of US adult citizens regularly

consume a vitamin supplement, most of which provide 400 µg of folic acid per pill. All of the above considerations are possible explanations for the fact that since 1998–2000 all studies performed in the United States that examined the effect of C677T *MTHFR* polymorphism found a protective effect for the TT genotype because folate intake was in the high range for most if not all persons (23, 24). In the study published by Le Marchand et al (25) the researchers observed that total folate intake was between 500 and 600 µg/d, whereas in the present series we observed an intake ≈400 µg/d. This different intake is a plausible explanation for the different results obtained in studies coming from Europe (26–28), Mexico (29), or even Australia (30) where the TT genotype was actually found to be associated with an increased risk of CRC. In neither Europe nor Australia has fortification with folic acid been implemented; therefore, it is likely that folate status is substantially lower than in the countries where fortification has taken place. In further support of this hypothesis, when we examined the interaction between folate intake and *MTHFR* polymorphism, we observed that low folate intake was particularly deleterious in TT carriers (OR: 14.0; 95% CI: 1.8, 108.5). The reason for not having observed a protective effect of folate intake in TT carriers probably relates to the fact that in our population folate intake might not reach the amount required that would change TT genotype into a protector factor.

In the present study we also examined the effect of a recently described polymorphism in *MTR*, A2756G (31). Similar to our present study, Ma et al (5) and Marchand et al (25) observed that

TABLE 3

Odds ratio (OR) of colorectal cancer according to C677T *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase) genotype and diet<sup>1</sup>

	C677T <i>MTHFR</i>		P for interaction
	CC/CT	TT	
Vitamin B-6			
High	0.83 (0.55, 1.26) <sup>2</sup>	1.77 (0.67, 4.68)	NS
Low	1	7.22 (1.6, 32.6)	
Vitamin B-12			
High	1.01 (0.67, 1.53)	2.71 (0.9, 8.0)	NS
Low	1	3.95 (1.2, 12.4)	
Folate			
High	0.77 (0.51, 1.17)	1.50 (0.59, 3.8)	0.05
Low	1	14.0 (1.8108.5)	
Glycine			
High	1.1 (0.7, 1.6)	2.0 (0.7, 5.3)	NS
Low	1	8.2 (1.8, 36.9)	
Methionine			
High	1.1 (0.75, 1.76)	2.1 (0.8, 6.2)	NS
Low	1	5.9 (1.6, 1.3)	
Serine			
High	0.92 (0.6, 1.4)	1.79 (0.63, 5.14)	NS
Low	1	5.7 (1.6, 20.4)	
Alcohol			
High	1.1 (0.72, 1.6)	3.5 (1.1, 11.3)	NS
Low	1	3.2 (1.1, 9.5)	

<sup>1</sup> Combined genotype wild-type-heterozygote (CC/CT) and low intake were the reference category for OR calculation (multiple regression). OR was adjusted for age, sex, and colorectal cancer history and determined with the values above or below the nutrient median intake. The cutoffs were as follows: vitamin B-6, 12.5 mg; vitamin B-12, 12.5 µg; folate, 406.7 µg; methionine, 2.58 mg; serine, 4.86 mg; glycine 4.68 mg, for alcohol, 3.4g/d.

<sup>2</sup> OR; 95% CI in parentheses (all such values).





*MTR* polymorphism was not associated with CRC risk, nor was there a significant interaction with any of the methyl-donor nutrients analyzed.

Finally, we also studied the C1420T *SHMT1* polymorphism. To our knowledge, there is only one study that examined the relation between *SHMT1* genotype and risk of CRC, and it did not observe any interaction (7). Recently, Van den Donk et al (32) studied the relation between this polymorphism, diet, and colorectal adenomas and concluded that the *SHMT1* C1420T polymorphism does not play a role in colorectal carcinogenesis. One hypothesis for this lack of association, which was postulated by Chen et al (8), is that *SHMT2* (another isoform of the same enzyme) can also supply the one-carbon units required for cytosolic folate metabolism. In the present series we observed that this polymorphism was associated with an increased risk of developing CRC, although the strength of our observation is limited by the small number of participants homozygous for the variant ( $n = 9$ ). Because the functional significance of this polymorphism is not yet known and because of the small numbers of homozygous participants, these results will need further confirmation.

In conclusion, in the present study we show that the C677T *MTHFR* polymorphism modifies the risk of developing CRC according to folate intake. To our knowledge, the influence of this genetic polymorphism was never examined in Southern European countries where pattern of folate and other methyl-donor nutrients, as well as alcohol, is certainly different from Northern Europe or American countries. Because mandatory folic acid fortification was never implemented in our country and vitamin supplements are not popular, it is believed that our population has a relatively low folate intake. This is a plausible explanation for the fact that, in our population, the TT genotype is associated with increased risk of developing CRC, particularly in participants with low folate intake (Table 3).

The author's responsibilities were as follows—CSG: design, subject evaluation, data collection, analysis, and manuscript preparation; BC: data collection, analysis, and manuscript preparation; SG: data collection; EC: analysis and manuscript preparation; PF: data collection; MB: data collection, manuscript preparation; CNL: data collection; MC: design, subject evaluation, data collection, analysis, and manuscript preparation. None of the authors had any financial or personal conflicts of interest.

## REFERENCES

- Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, Eaton A, Biscocho L, Martin C. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1611–21.
- Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002;132(suppl):2412S–8S.
- Kune G, Watson L. Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene. *Nutr Cancer* 2006;56(1):11–21.
- Crott J, Mason J. *MTHFR* polymorphisms and colorectal neoplasia. In: Ueland PM, and Rozen R, eds. *MTHFR polymorphisms and disease*. Austin, TX: Landes Bioscience, 2004;
- Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:825–9.
- Ulvik A, Vollset SE, Hansen S, Gislefoss R, Jellum E, Ueland PM. Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C → T and methionine synthase 2756A → G polymorphisms: a study of 2,168 case-control pairs from the JANUS Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:2175–80.
- Luebeck EG, Moolgavkar SH, Liu AY, et al. Does folic acid supplementation prevent or promote colorectal cancer? Results from model-based predictions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(6):1360–7.
- Chen J, Kyte C, Valcin M, et al. Polymorphisms in the one-carbon metabolic pathway, plasma folate levels and colorectal cancer in a prospective study. *Int J Cancer* 2004;111(4):617–20.
- Guerreiro CS, Cravo ML, Brito M, Vidal PM, Fidalgo PO, Leitão CN. The D1822V APC polymorphism interacts with fat, calcium, and fiber intakes in modulating the risk of colorectal cancer in Portuguese persons. *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1592–7.
- Lopes CM. Reprodutibilidade e validação do questionário semi quantitativo de frequência alimentar. In: *Alimentação e Enfarte agudo do miocárdio: Estudo de caso-controlo de base comunitária*. PhD thesis. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto Porto. 2000;78–115.
- Arroll B, Jackson R, Beaglehole R. Validation of a three-month physical activity recall questionnaire with a seven-day food intake and physical activity diary. *Epidemiology* 1991;2:296–9.
- Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms and implications. *J Nutr Biochem* 1999;10:66–85.
- Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001;475:57–67.
- Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 2001;475:7–20.
- Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999;55:578–92.
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine, low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995;15:87(4):265–73.
- Su LJ, Arab L. Nutritional status of folate and colon cancer risk: evidence from NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol* 2001;11(1):65–72.
- Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(7):1325–9.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111–3.
- Friso S, Choi S, Girelli D, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(8):5606–11.
- Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:4862–64.
- Cravo LG, Camilo ME, Resende M, et al. DNA methylation and sub-clinical vitamin deficiency of folate, pyridoxal-phosphate and vitamin B12 in chronic alcoholics. *Clin Nutrition* 1997;16:29–33.
- Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098–102.
- Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999;8:513–8.
- Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2002;13:239–48.
- Ryan BM, Molloy AM, McManus R, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene in colorectal cancer: role in tumour development and significance of allelic loss in tumor progression. *Int J Gastrointest Cancer* 2001;30(3):105–11.
- Sachse C, Smith G, Wilkie M, et al. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2002;23(11):1839–50.
- Plaschke J, Schwanebeck U, Pistorius S, Saeger HD, Schackert HK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of sporadic and hereditary colorectal cancer with or without microsatellite instability. *Cancer Lett* 2003;10:191(2):179–85.
- Delgado-Enciso I, Martinez-Garza SG, Rojas-Martinez A, et al. 677T mutation of *MTHFR* gene in adenomas and colorectal cancer in a pop-



1418

GUERREIRO ET AL

- ulation sample from the Northeastern Mexico. Preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex* 2001;66(1):32-7.
30. Shannon B, Gnasampanthan S, Beilby J, Lacopetta BA. Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 2002;50(4):520-4.
31. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):3059-64.
32. Van den Donk M, Visker MH, Harryvan JL, Kok FJ, Kampman E. Dietary intake of B-vitamins, polymorphisms in thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase 1, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Lett* 2007;18:250(1):146-53.





## 5' and 3' UTR thymidylate synthase polymorphisms modulate the risk of colorectal cancer independently of the intake of methyl group donors

BRUNO CARMONA<sup>1</sup>, CATARINA GUERREIRO<sup>1</sup>, MARÍLIA CRAVO<sup>2</sup>,  
CARLOS NOBRE-LEITÃO<sup>2</sup> and MIGUEL BRITO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Av. D. João II, Lote 4.69.01, Parque das Nações, 1990-096 Lisboa;

<sup>2</sup>Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil de Lisboa, Rua Prof. Lima Basto, 1093 Lisboa Codex, Portugal

Received May 5, 2008; Accepted June 9, 2008

DOI: 10.3892/mmr\_00000023

**Abstract.** Thymidylate synthase, as a rate-limiting step in DNA synthesis, catalyses the conversion of dUMP into dTMP using 5,10-methylenetetrahydrofolate as the methyl donor. Two polymorphisms have been described in this gene: a repeat polymorphism in the 5' promoter enhancer region (3R versus 2R) and a 6 bp deletion in the 3' untranslated region. Both of these may affect protein levels. The present case control study was aimed at investigating the influence of these two polymorphisms on the development of colorectal cancer (CRC), as well as their potential interaction with folate, vitamin B6 and vitamin B12 intake. A total of 196 cases and 200 controls, matched for age and sex distribution, were included in the study. No association was found between CRC and the 28 bp repeat polymorphism, but it was observed that individuals with the 6 bp/del and del/del genotypes had a significantly lower risk of developing the disease (OR=0.47; 95% CI 0.30-0.72). A combined genotype (2R/2R; 6 bp/del+del/del) was also found, which was associated with an even lower risk of developing of the disease (OR=0.42; 95% CI 0.26-0.69). No significant interaction between these polymorphisms and vitamin intake was observed. These results indicate for the first time that the 6 bp/del allele might be a protective factor in the development of CRC, independent of the intake of methyl group donors.

### Introduction

Colorectal cancer (CRC) is today one of the most prevalent cancers in developed societies (1), representing 9.4% of cancers in males and 10.1% in females (2). In Portugal, it is among

the leading causes of cancer, and has one of the highest mortality rates in Europe (3,4).

It is well known that the etiology of this tumour is multifactorial, involving both environmental and genetic factors (5,6). One of the factors that has been associated with a decreased risk of CRC is the high consumption of folate (7-9). Several studies suggest an inverse association between folate status, either its intake or blood measurements, and the risk of this malignancy (10). The potential mechanisms whereby deficiency enhances and supplementation suppresses CRC have been extensively reviewed (11-13), and are related to the involvement of this vitamin in the mediation of the transfer of 1-carbon units (Fig. 1). Through this apparently simple function, folate plays a key role in a number of processes related to DNA integrity, such as DNA synthesis and DNA methylation (11-15). This explains why a number of *in vitro* and *in vivo* studies have shown that folate deficiency results in DNA strand breaks, DNA hypomethylation, impaired DNA repair and increased mutagenesis (11-15).

In a number of these studies, the observed inverse association between folate status and CRC risk was further modified by genetic polymorphisms of the enzymes involved in folate metabolism, namely methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and thymidylate synthase (TS). The former is an enzyme critical to folate metabolism that catalyses the irreversible conversion of 5,10-methyleneTHF into 5-methylTHF, thereby playing an important role in DNA methylation and synthesis (Fig. 1). A number of previous studies suggest that folate supplementation might be particularly effective in reducing the risk of CRC in subjects carrying the polymorphic allele C677T for MTHFR (16-19), as this polymorphism causes thermolability and reduced MTHFR activity. TS is the enzyme responsible for the conversion of deoxyuridine monophosphate (dUMP) into deoxythymidine monophosphate (dTMP), and competes with MTHFR for 5,10-methyleneTHF as the substrate of this methylation reaction (20). In respect to TS, a tandem repeat polymorphism has been identified in the 5'UTR enhancer region of the TS promoter that contains either triple (3R) or double (2R) repeats of a 28-bp sequence (21). Individuals homozygous for triple repeats have TS mRNA levels 3.6 times higher than those homozygous for the double repeat genotype (22). Another 6-bp deletion in the

---

**Correspondence to:** Dr Miguel Brito, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Av. D. João II, Lote 4.69.01, Parque das Nações, 1990-096 Lisboa, Portugal  
E-mail: miguel.brito@estesl.ipl.pt

**Key words:** thymidylate synthase polymorphisms, colorectal cancer, folate, vitamin B6, vitamin B12, methyl group donors

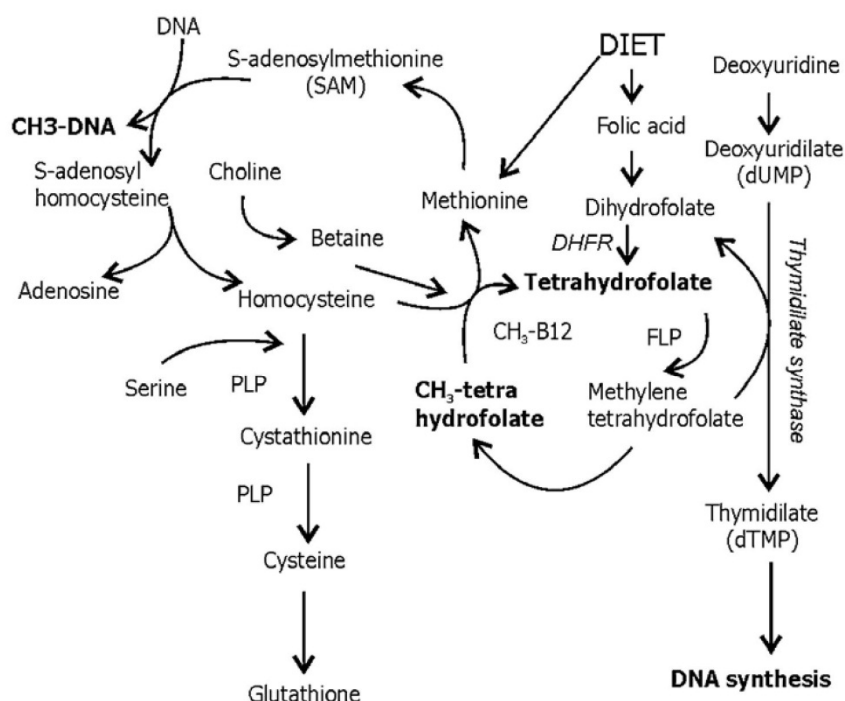


Figure 1. Folic acid cycle.

3'UTR of the TS gene has been identified, and previous studies have reported that tumour mRNA levels in patients with a homozygous wild-type genotype are 4.2-fold higher than those of patients with a homozygous variant genotype (23). Most studies have examined the importance of these polymorphisms in predicting either survival or response to 5-FU-based chemotherapy in tumours with a high expression of TS that are responding poorly to this agent and have a worse survival prognosis (24). To our knowledge, very few studies have examined whether these polymorphisms of the TS gene influence the risk of developing colorectal neoplasms. The results obtained from those that have been conducted are subject to some discrepancies (25-31).

The aim of this case-control study was to examine the potential influence of the two abovementioned TS UTR (untranslated region) polymorphisms on the development of CRC in a Portuguese population group, as well as to investigate potential interactions between these polymorphisms and the intake of methyl donor compounds, such as folate and vitamins B6 and B12.

## Materials and methods

**Study population.** This case-control study was performed at the Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil EPE (IPOLFG). The study was approved by the Scientific and Ethics committees of IPOLFG, and both patients and controls gave their informed written consent for participation.

The patient group comprised 196 subjects (104 males, 92 females; mean age  $64.2 \pm 11.3$ ) with a histologic diagnosis of CRC, and the control group 200 healthy blood donor volunteers recruited from the same institute with a similar sex and

age distribution (106 males, 94 females; mean age  $62.2 \pm 12.1$ ) and with no previous history of cancer at any site. Of the patients, 169/196 (86.5%) had recently been diagnosed with CRC, while the remaining 27 (13.5%) were being treated for disease relapse. In terms of previous therapies, 119/196 (60.7%) had not received any form of treatment, 28/196 (14.3%) had already been operated on, 13/196 (6.6%) had undergone pelvic radiotherapy, 11/196 (5.6%) had received one or more cycles of chemotherapy, and the remaining 25/196 (12.8%) had undergone combined forms of treatment. TNM staging was as follows: stage I, 24/178 (13.5%); stage II, 64/178 (35.9%); stage III, 53/178 (29.8%); stage IV, 37/178 (20.8%). All subjects were Caucasian.

**Nutritional evaluation.** In order to quantify folate, vitamin B6 and vitamin B12 intake, we used a Food Frequency Questionnaire validated for a Portuguese population (32). Participants were asked to recall their habits in the year before CRC diagnosis (patients), or in the year prior to the interview (controls). Data on the type and quantity of food intake was then analysed using modified database Food Processor software, version 7 (Esha Research Inc. Salem, USA), which includes some Portuguese food items, allowing for the quantification of different macro- and micronutrients. Nutrient values were calculated from food and from supplements (taken by 11/196 of patients and by none of the controls).

**Genotyping of polymorphisms.** DNA was extracted from peripheral blood collected by digital puncture using the Generation Capture Card Kit (Gentra Systems). Fragments were amplified using specific primers for each allelic determination (5'-CCTGGCGCACGCTCTCTA-3' and 5'-GATCTG



Table I. Mean intake of nutrients in the two population groups and odds ratio of the interaction between nutrient intake and colorectal cancer susceptibility.

Nutrients	Mean intake ( $\mu\text{g/day}$ )		Odds ratio (95% CI)		
	Cases	Controls	Low	High	P-value
Vitamin B6	2.83 $\pm$ 1.06	2.85 $\pm$ 0.98	1	0.71 (0.52-1.07)	0.10
Vitamin B12	14.53 $\pm$ 9.05	14.36 $\pm$ 8.22	1	0.89 (0.59-1.34)	0.58
Folic acid	401.57 $\pm$ 161.88	433.40 $\pm$ 161.32	1	0.67 (0.45-1.02)	0.06

Nutrient intake was divided in two groups: low, meaning intake lower than the calculated median, and high, meaning intake higher than the median. Control median intake of: vitamin B6, 2.82  $\mu\text{g/day}$ ; vitamin B12, 12.63  $\mu\text{g/day}$ ; folic acid, 422.22  $\mu\text{g/day}$ .

Table II. Allelic and genotypic distribution of the 28 bp tandem repeat and 6 bp deletion polymorphism alleles in the two population groups.

	No. cases (%)	No. controls (%)	P-value
28 bp repeat			
2R/2R	24 (13.9)	30 (17.6)	0.330
2R/3R	102 (59.0)	87 (51.2)	
3R/3R	47 (27.1)	53 (31.2)	
2R	150 (0.434)	147 (0.432)	1.000
3R	196 (0.566)	193 (0.568)	
6 bp deletion			
6 bp/6 bp	99 (53.5)	72 (37.3)	0.006
6 bp/del	69 (37.3)	100 (51.8)	
del/del	17 (9.2)	21 (10.9)	
6 bp	267 (0.722)	244 (0.632)	<0.010
del	103 (0.278)	142 (0.368)	

Analysis performed using the  $\chi^2$  test.

CCCCAGGTACTGC-3' for the 28 bp polymorphism; 5'-TTT CACAAGCTATTCCTCAAA-3' and 5'-CAGAATGAA CAAAGCGTGGA-3' for the 6 bp polymorphism). Both polymorphism fragments were amplified using 1.5 U of Taq polymerase (Fermentas, Ontario, Canada) with a primer concentration of 200 nM and a  $\text{Mg}^{2+}$  concentration of 2.5 mM. The 28 bp polymorphism fragment was amplified in the presence of 2X concentrated Enhancer Solution (Invitrogen, CA, USA). Amplification steps were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. A final extension step was performed at 72°C for 10 min.

The 28 bp TS genotype was determined by separation of the fragments on 2% agarose gel. In the case of the 6 bp deletion genotype, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis was used with 10 U of DraI restriction enzyme (New England Biolabs, MA, USA) incubated at 37°C for 2 h, followed by separation of the fragments on 4% agarose gel.

**Statistical analysis.** Odds ratio (OR) analysis was performed using binary logistic regression adjusted for sex, age and family history. Interaction between the polymorphisms and nutrient intake was evaluated by the likelihood ratio test. All analyses were performed using SPSS software, version 15.0.

## Results

Of the total 196 patients and 200 controls included in this study, 173 patients and 170 controls were used in the analysis of the 28 bp repeat polymorphism, and 185 cases and 193 controls were used in the 6 bp deletion polymorphism. This was because certain DNA samples had failed to be amplified by PCR.

The mean daily intake of folate and vitamins B6 and B12 of the patients and controls is shown in Table I. To test whether the intake of these nutrients influenced the risk of developing CRC, patients and controls were respectively divided into two groups according to whether their intake was higher or lower than the calculated median of the control population, followed by an OR calculation (Table I). A daily intake of folate above 422.2 $\pm$ 161.3  $\mu\text{g/day}$  was found to be associated with a 33% decreased risk of developing CRC (OR=0.67; 95% CI 0.45-1.02). No significant differences were observed for vitamin B6 or B12.

Genotypic and allelic distributions of the 28 bp repeat polymorphism and the 6 bp deletion polymorphism for both cases and controls are presented in Table II. In the 28 bp repeat polymorphism, one sole individual was found to have four repeats. Since the functional consequences of this four repeat allele are not well known, the subject was excluded from the analysis. Regarding genotypic distribution, both cases and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium for the two polymorphisms. No significant differences between cases and controls were observed in respect to the 28 bp repeat polymorphism ( $P>0.05$ ). In contrast, the 6 bp deletion polymorphism was found to have a statistically significant ( $P<0.010$ ) higher frequency of the del allele in controls as compared to cases. This finding strengthens the hypothesis that the presence of the del allele, in either heterozygosity or homozygosity, represents a protective effect. As shown in Table III, the 6 bp/del and del/del genotypes were observed to be associated with a reduction in the risk of CRC (OR=0.47; 95% CI 0.30-0.72). However, the 28 bp repeat polymorphism showed no significant association with the risk of CRC (OR=1.33; 95% CI 0.74-2.39).



Table III. Odds ratio analysis for the polymorphisms.

Polymorphism	Odds ratio (95% CI)		P-value
	2R/2R	2R/3R+3R/3R	
28 bp repeat	1	1.29 (0.71-2.36)	0.41
	6 bp/6 bp	6 bp/del+del/del	
6 bp deletion	1	0.47 (0.30-0.72)	0.001

Odds ratios were calculated using binary logistic regression adjusted for age, sex and family history.

OR analysis was performed in order to test whether there could be a combined genotype of this gene influencing CRC development. The analysis compared individuals homozygous for the 2R allele in the 28 bp repeat polymorphism and those heterozygous or homozygous for the del allele in the 6 bp deletion polymorphism (2R/2R, 6 bp/del+6 bp/del) with the remaining individuals. It was observed that individuals carrying this combined genotype were at an even lower risk of developing CRC (OR=0.42; 95% CI 0.29-0.73).

When the interaction between these polymorphisms and the intake of the three vitamins was tested, no significant associations were observed for either of the polymorphisms (data not shown). We also found no correlation between the polymorphisms and tumour location, disease staging, response to chemoradiotherapy or survival (data not shown).

## Discussion

Folate, a water soluble B vitamin, has been shown to protect against cancer at several sites, including the colon (11,13). Epidemiologic and clinical studies indicate that dietary folate intake and blood folate levels are inversely associated with the risk of developing both adenomas and CRC (7-9). Animal studies have also unequivocally established a causal relationship between folate deficiency and CRC (33). In a subsequent study (34), Kim *et al* demonstrated that the modulating effect of folate on CRC was dependent on both the timing and dose of folate intervention. More recently, some authors have raised the question of whether folate supplements taken by individuals already harbouring pre-malignant lesions can in fact increase the risk of CRC (35,36). The mechanisms by which folate intake modulates the risk of malignancy are probably related to the fact that folate supplies the methyl group for either DNA methylation or for uracil conversion to thymidine (10,12,37). Recent epidemiologic molecular studies have also suggested that the protective effect of folate could be further modified by interactions with genetic polymorphisms in the genes codifying the enzymes involved in folate metabolism. The most extensively studied genetic polymorphism is the C677T polymorphism of the MTHFR gene, which may influence the risk of CRC according to folate status, alcohol intake and the supply of methyl group donors, such as methionine, vitamins B6 and B12 (13,38).

Most studies on TS, which converts dUMP to dTMP as a rate-limiting step in DNA synthesis, have examined the impact of the 28 bp repeat and 6 bp/del polymorphisms on prognosis, or have evaluated them as indicators of response to 5-FU. Few studies have evaluated the influence of these polymorphisms on the aetiology of CRC, and those that have done have achieved discrepant results. For example, in respect to colorectal adenomas, which are the precursor lesions for CRC, Ulrich *et al* (23) observed that the TS 28 bp tandem repeat polymorphism was not an independent risk factor for colorectal adenomas. However, there was a statistically significant gene-nutrient interaction with dietary folate intake: in individuals with the 3R/3R genotype, folate intake over 440 µg/day was associated with decreased risk, whereas in individuals with the 2R/2R variant, a 1.5-fold increased risk was observed with high folate intake. In the same study, the TS 6 bp deletion polymorphism was not demonstrated to modify the risk for colorectal adenomas, nor was any association with folate intake found. In contrast, in a case-control study nested within a prospective Health Professionals Follow-up Study, Chen *et al* (39) observed significant interaction between the TS 28 bp promoter polymorphism and alcohol intake, which modulated the risk of developing colorectal adenomas. The effect of the 6 bp/del polymorphism was not examined in that study (39).

As regards the influence of these polymorphisms on CRC development Ulrich *et al* observed that men carrying the 2R/2R genotype had a 30% decreased risk of CRC compared to those with the homozygous 3R genotype. No association was found for the 6 bp polymorphism (31). Chen *et al* (40), using the same study design within the prospective Physicians' Health Study, observed no association between the risk of CRC and the 6 bp/del polymorphism. However, in regard to the 28 bp polymorphism, individuals with the 2R allele had a non-significant decreased risk of CRC compared to those with the 3R/3R genotype. This suggests a protective effect for the 2R allele. Additionally, none of the compound genotypes significantly influenced the risk of CRC, nor was any modulating effect of folate status observed. These results are in only partial agreement with the current findings. This study also demonstrated that folate intake *per se* had a protective effect against the risk of developing CRC (OR=0.67; 95% CI 0.45-0.99). Our findings with respect to TS polymorphisms were similar to those of Chen *et al* (40) and Ulrich *et al* (31), in that differences regarding the 28 bp polymorphism were non-significant. However, in contrast with the results obtained by Ulrich *et al* (31), who found that the TS 6 bp polymorphic allele was not associated with a decreased risk of CRC, in the present study individuals homozygous or heterozygous for this variant carried a significantly and unequivocally lower risk of developing CRC. Furthermore, by combining the protective effects of the 6 bp/del allele and the 28 bp 2R allele, we found a combined genotype of the TS gene (2R/2R, 6 bp/del+del+6 bp/del), which was associated with a 58% decreased risk of developing CRC. In agreement with Chen *et al* (40), no significant interactions between these genetic polymorphisms and folate intake were observed in the present study.

The reasons for the discrepancies observed among these studies are not readily apparent. However, it is worth noting that all previous studies on the influence of these genetic poly-



morphisms on the risk of developing colorectal adenomas or CRC were performed in North America, where the diet is certainly very different from the average dietary intake in Portugal. One could also speculate that interactions with other genetic polymorphisms could explain these differing results. However, no statistically significant differences were found between the genotypic distribution of the present study and that of others (31,40), with the exception of the genotypic distribution of the 28 bp repeat allele compared to the cancer population used by Ulrich *et al* ( $P < 0.05$ ) (data not shown) (31). In a previous study using the same population as the current study, we analysed polymorphisms in folate metabolizing enzymes involved in the DNA methylation cycle, including C677T polymorphisms of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR). No interaction was observed between the two polymorphisms of TS analysed in the present study and the C677T polymorphism of MTHFR in terms of modulating the risk of CRC (unpublished results).

Altogether, the findings of this and previous studies (31,40) suggest that alleles resulting in decreased gene expression exhibit a protective effect against the development of CRC. As these polymorphisms contribute to the final intracellular concentration of TS protein, we further investigated the role of two combined genotypes (2R/2R+6 bp/del, del/del) in the development of CRC. Since the 2R allele is associated with a decreased translation level of the TS mRNA, and the del allele with TS mRNA instability, individuals with these combined genotypes should have a decreased TS protein level. Indeed, such individuals were found to have a 2.4x reduction in the risk of developing CRC. It is therefore safe to hypothesize that low TS protein levels lead to a reduction in the risk of developing CRC. This may be due to the fact that TS and MTHFR compete for the same substrate (5,10-methyleneTHF). High TS levels would lead to a depletion of the 5,10-methyleneTHF pool, which could impair the conversion of homocysteine into methionine (Fig. 1). Methionine is the immediate precursor of S-Adenosylmethionine, the universal methyl donor for several compounds, including DNA. Thus, at least theoretically, elevated TS activity could impair DNA methylation, which has been widely recognized as an important epigenetic mechanism for the control of gene transcription. This hypothesis needs to be further confirmed, and is currently being tested.

To the best of our knowledge, this is the first study performed in a southern European country demonstrating a protective effect for both the 6 bp/del allele *per se*, as well as for a compound genotype including this allele and the 2R allele from the 28 bp polymorphism. These protective effects do not appear to be mediated by folate or by other methyl group donor intake.

Although future studies are required to elucidate why the same polymorphisms have differing roles in different populations, our results contribute to the understanding of the complex interaction between genes and nutrients in the modulation of cancer risk.

#### Acknowledgements

This work was funded by a grant from the Fundação Calouste Gulbenkian No. 68925/2005.

#### References

1. Wilmink ABM: Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 40: 483-493, 1997.
2. Boyle P and Langman JS: ABC of colorectal cancer: epidemiology. *BMJ* 321: 805-808, 2000.
3. Bingham S and Riboli E: Diet and cancer - the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat Rev Cancer* 4: 206-215, 2004.
4. Pinheiro PS, Tyczynski JE, Bray F, Amado J, Matos E and Parkin DM: Cancer incidence and mortality in Portugal. *Eur J Cancer* 39: 2507-2520, 2003.
5. Campos FG, Logullo Waitzberg AG, Kiss DR, Waitzberg DL, Habr-Gama A and Gama-Rodrigues J: Diet and colorectal cancer: current evidence for aetiology and prevention. *Nutr Hosp* 20: 18-25, 2005.
6. Willett W: The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 338: 389-394, 1989.
7. Sanjoquin MA, Appleby PN, Thorogood M, Mann J and Key TJ: Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *Br J Cancer* 90: 118-121, 2004.
8. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L and Wolk A: Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 93: 525-533, 2001.
9. Thun MJ, Calle EE, Namboodiri MM, *et al*: Risk factors for fatal colon cancer in a large prospective study. *J Natl Cancer Inst* 84: 1491-1500, 1992.
10. Zhang SM, Moore SC, Lin J, Cook NR, Manson JE, Lee IM and Buring JE: Folate, vitamin B6, multivitamin supplements, and colorectal cancer risk in women. *Am J Epidemiol* 163: 108-115, 2006.
11. Choi S-W and Mason JB: Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 132: S2413-S2418, 2002.
12. Fenech M: The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 475: 57-67, 2001.
13. Kim YI: Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem* 10: 66-88, 1999.
14. Ames BN: DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 475: 7-20, 2001.
15. Duthie SJ: Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 55: 578-592, 1999.
16. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, *et al*: A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 56: 4862-4864, 1996.
17. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, *et al*: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 57: 1098-1102, 1997.
18. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D and Leppert M: Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 513-518, 1999.
19. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, *et al*: Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 659-668, 1999.
20. Sharp L and Little J: Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGe review. *Am J Epidemiol* 159: 423-443, 2004.
21. Takeishi K, Kaneda S, Ayusawa D, Shimizu K, Gotoh O and Seno T: Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. *Nucl Acids Res* 13: 2035-2043, 1985.
22. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, *et al*: Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 1: 65-70, 2001.
23. Ulrich CM, Bigler J, Bostick R, Fosdick L and Potter JD: Thymidylate synthase promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 62: 3361-3364, 2002.
24. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, *et al*: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6: 1322-1327, 2000.
25. Curtin K, Ulrich CM, Samowitz W, Bigler J, Caan B, Potter JD and Slattery ML: Thymidylate synthase polymorphisms and colon cancer: associations with tumor stage, tumor characteristics and survival. *Int J Cancer* 120: 2226-2232, 2007.
26. Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, *et al*: Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 24: 1603-1611, 2006.

27. Hitre E, Budai B, Adleff V, *et al*: Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet Genomics* 15: 723-730, 2005.
28. Marsh S and McLeod HL: Thymidylate synthase pharmacogenetics in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 1: 175-178, 2001.
29. Marsh S, McKay JA, Cassidy J and McLeod HL: Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol* 19: 383-386, 2001.
30. Tsuji T, Hidaka S, Sawai T, *et al*: Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region is not an efficacious marker for tumor sensitivity to 5-fluorouracil-based oral adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 9: 3700-3704, 2003.
31. Ulrich CM, Curtin K, Potter JD, Bigler J, Caan B and Slattery ML: Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2509-2516, 2005.
32. Lopes C: Nutrition and acute myocardial infarction: community case control study. PhD Thesis, College of Medicine, Porto University, Portugal, 2000.
33. Cravo ML, Mason JB, Dayal Y, Hutchinson M, Smith D, Selhub J and Rosenberg IH: Folate deficiency enhances the development of colonic neoplasia in dimethylhydrazine-treated Rats. *Cancer Res* 52: 5002-5006, 1992.
34. Kim YI, Salomon RN, Graeme-Cook F, Choi SW, Smith DE, Dallal GE and Mason JB: Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose responsive manner in rats. *Gut* 39: 732-740, 1996.
35. Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G and Rosenberg IH: A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1325-1329, 2007.
36. Ulrich CM and Potter JD: Folate and cancer - timing is everything. *JAMA* 297: 2408-2409, 2007.
37. Otani T, Iwasaki M, Hanaoka T, *et al*: Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitamin B2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan. *Nutr Cancer* 53: 42-50, 2005.
38. Kim YI: Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev* 58: 205-209, 2000.
39. Chen J, Kyte C, Chan W, Wetmur JG, Fuchs CS and Giovannucci E: Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 2247-2250, 2004.
40. Chen J, Hunter DJ, Stampfer MJ, *et al*: Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region modifies the risk and survival of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 958-962, 2003.